



**BIBLIOTECA**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Universidade de São Paulo**

RECEBIDA 27/05/2002  
Milda

DU 11

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

25652  
1271750

**ISOLAMENTO DE GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS  
EXCRETADAS-SECRETADAS PELO *Trypanosoma cruzi* (TESA)  
COM POTENCIAL PARA IMUNODIAGNÓSTICO**

**TOKIKO KYOMEN MATSUMOTO**

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Eufrosina Setsu Umezawa

São Paulo  
2002

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

**ISOLAMENTO DE GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS  
EXCRETADAS-SECRETADAS PELO *Trypanosoma cruzi* (TESA)  
COM POTENCIAL PARA IMUNODIAGNÓSTICO**

TOKIKO KYOMEN MATSUMOTO

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Eufrosina Setsu Umezawa

São Paulo  
2002

DEDALUS - Acervo - CQ



30100004888

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Matsumoto, Tokiko Kyomen  
M434i Isolamento de genes que codificam proteínas excretadas-  
secretadas pelo *Trypanosoma cruzi* (TESA) com potencial  
para imunodiagnóstico / Tokiko Kyomen Matsumoto. --  
São Paulo, 2002.  
1v.(paginação irregular).

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises  
Clínicas e Toxicológicas.  
Orientador: Umezawa, Eufrosina Setsu

1. Imunologia 2. Imunodiagnóstico 3. Biologia molecular  
4. Doença de Chagas : Medicina I. T. II. Umezawa, Eufrozina  
Setsu, orientador

615.37 CDD

TOKIKO KYOMEN MATSUMOTO

ISOLAMENTO DE GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS  
EXCRETADAS-SECRETADAS PELO *Trypanosoma cruzi* (TESA) COM  
POTENCIAL PARA IMUNODIAGNÓSTICO

Comissão Julgadora da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

---

Profa. Dra. Eufrosina Setsu Umezawa  
orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

---

3º. examinador

---

4º. examinador

São Paulo,

A minha estimada filha Juliana,  
razão e incentivo da minha jornada.

---

## **AGRADECIMENTOS:**

À Profa. Dra. Eufrosina Setsu Umezawa pela orientação e oportunidade de aperfeiçoamento.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Cotrim pela co-orientação e ensinamentos na área de Biologia Molecular, o meu apreço e reconhecimento.

Ao Prof. Dr. José Franco da Silveira, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Doenças Parasitárias da UNIFESP, pelas diretrizes seguras, valiosas sugestões e colaboração na realização da parte experimental deste trabalho.

À Profa. Dra. Anna Maria Simonsen Stolf pela convivência, amizade, colaboração e intercâmbio de conhecimentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP em nome de seu Diretor Prof. Dr. Marcos Boulos, pela colaboração e suporte técnico que foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Instituto Adolfo Lutz, em nome de seu Diretor, Dr. Cristiano Correa de Azevedo Marques, pelo apoio e oportunidade de aprimoramento técnico.

À Dra. Mirthes Ueda, do Instituto Adolfo Lutz, pelo permanente incentivo e inesgotável apoio para a realização deste trabalho.

À Dra. Júlia Martins Souza Felipe, Diretora da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, pela valiosa contribuição de apoio para o término desta tese.

À Profa. Dra. Sumie Hoshino Shimizu do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela inestimável colaboração nas correções deste trabalho, ao ser submetido para qualificação.

Ao Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata, pela avaliação e sugestões na qualificação que contribuíram na melhoria da apresentação final da tese.

À Profa. Kioko Takei, pela avaliação minuciosa e sugestões valiosas na qualificação que possibilitaram uma melhor compreensão deste trabalho.

À Profa. Dra. Márcia Regina Machado dos Santos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Doenças Parasitárias da UNIFESP, pelas sugestões valiosas na qualificação e pelo acolhimento e apoio técnico na realização de uma parte experimental deste trabalho.

À Pesquisadora Científica, Dra. Vera Pereira Chiocolla, da Diretoria do Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, pelas sugestões benéficas na correção deste trabalho.

À amiga e Pesquisadora Científica do Instituto Butantan, Dra. Hana Suzuki, pelo constante apoio e correção criteriosa elaborada no resumo e no abstract deste trabalho.

Aos colegas do Instituto de Medicina Tropical, em especial à Rosely Malafronte, Marilda Savoia Nascimento, Sueli F. Bastos, Norival Kesper Jr, Mônica de Paula Leal e Paulo de Oliveira, pela convivência, amizade, colaboração e apoio técnico que foram fundamentais para a viabilização deste trabalho.

Aos colegas da Universidade Federal de São Paulo, Newton V. Verbisck e ao Prof. Dr. Jorge Araya, pela convivência e valiosa colaboração técnica em experimentos de parte deste trabalho.

A todos os colegas da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, em especial à Chefe e Pesquisadora Científica Dra. Maria das Graças Adelino Alkmin, pelo apoio e às Pesquisadoras Científicas, Dra. Lourdes Redher de Andrade Vaz e Lima e Dra Maria Luisa Barbosa, pela valiosa colaboração na fase de correção da tese.

Às bibliotecárias Leila Aparecida Bonadio e Adriana de Almeida Barreiros, da Biblioteca do Conjunto das Químicas da USP, pela revisão das referências bibliográficas.

À Célia Maria Ponteio Mome, da Seção de Desenho do Instituto Adolfo Lutz, pela digitalização das imagens de parte das figuras desta tese.

Aos amigos e colegas, pela solidariedade, estímulo e compreensão, e a todos que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

---

## ÍNDICE

	PÁG.
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 DOENÇA DE CHAGAS.....	01
1.2 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	03
1.2.1 DESEMPENHO DIAGNÓSTICO.....	04
1.3 ANTÍGENOS ALVOS DE ANTICORPOS LÍTICOS.....	06
1.4 EXO-ANTÍGENOS DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	09
1.4.1 FAMÍLIA TRANS-SIALIDASE DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	11
1.4.2 ANTÍGENOS RECOMBINANTES NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.....	15
1.5 JUSTIFICATIVA.....	18
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E ANTIBIÓTICOS.....	25
3.1.1 MEIOS DE CULTURA.....	25
3.1.2 SOLUÇÕES.....	25
3.1.3 ANTIBIÓTICOS.....	27
3.2 BACTÉRIAS E BACTERIÓFAGOS.....	27
3.2.1 BACTÉRIAS.....	27
3.2.2 BACTERIÓFAGOS.....	28
3.3 ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E ENZIMAS MODIFICADORAS DE DNA.....	30
3.4 OBTENÇÃO DE DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DO <i>T. CRUZI</i> .....	30
3.5 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO EXCRETADO E SECRETADO DO <i>T. CRUZI</i> (TESA).....	31
3.6 PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-TESA POR AFINIDADE AO TESA-BLOT.....	31
3.7 SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES COM ANTICORPOS ANTI-TESA.....	32
3.7.1 SELEÇÃO DE UMA BIBLIOTECA GENÔMICA DO <i>T. CRUZI</i> .....	32
3.7.2 SELEÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE cDNA DO <i>T. CRUZI</i> .....	33
3.8 SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES DE UMA BIBLIOTECA DE cDNA DO <i>T. CRUZI</i> POR SONDA.....	34
3.8.1 OBTENÇÃO DA SONDA.....	35
3.8.2 MARCAÇÃO COM <sup>32</sup> P.....	35
3.8.3 REAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS.....	36
3.9 ISOLAMENTO DE CLONES RECOMBINANTES.....	36
3.10 TÉCNICA DE DOT-BLOT.....	37
3.11 PROCESSO DE LISOGENIZAÇÃO DE CLONES DO $\lambda$ gt11.....	38
3.12 ABSORÇÃO DE SOROS COM EXTRATOS BACTERIANOS.....	38
3.13 PROCESSO DE EXCISÃO <i>IN VIVO</i> PARA FORMAÇÃO DO "FAGEMÍDEO" pBKCMV.....	39
3.14 OBTENÇÃO DO DNA.....	40
3.14.1 EXTRAÇÃO DO DNA FÁGICO.....	40
3.14.2 EXTRAÇÃO DO DNA PLAMIDIAL.....	41
3.15 AMPLIFICAÇÃO DE DNA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	42
3.16 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	42
3.17 PURIFICAÇÃO DO DNA.....	43
3.18 SUBCLONAGEM DOS INSERTOS.....	43
3.19 TRANSFORMAÇÃO DAS BACTÉRIAS COM PLASMÍDEOS RECOMBINANTES.....	44
3.20 ANÁLISE E TRIAGEM DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES.....	45
3.21 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	45
3.22 SEQUENCIAMENTO DE CLONES RECOMBINANTES.....	46
3.22.1 SEQUENCIAMENTO MANUAL.....	46
3.22.2 SEQUENCIAMENTO SEMI-AUTOMÁTICO.....	47
3.22.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS.....	47
3.23 EXPRESSÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE TESA-1.....	48
3.24 PURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE TESA-1 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	48
3.25 PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-TESA-1.....	49
3.26 AMOSTRAS DE SOROS.....	49
3.26.1 SOROS CHAGÁSICOS.....	50
3.26.2 SOROS NÃO CHAGÁSICOS.....	50
3.27 ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE TESA-1 PELA TÉCNICA DE "IMMUNOBLOTTING".....	51



4.	RESULTADOS.....	53
4.1.	ANTICORPOS ELUÍDOS POR AFINIDADE DO TESA-BLOT.....	53
4.2	ISOLAMENTO DE CLONES RECOMBINANTES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS EXCRETADAS-SECRETADAS DO <i>T. CRUZI</i> , UTILIZANDO UMA BIBLIOTECA GENÔMICA, CONSTRUÍDA NO BACTERIÓFAGO DE EXPRESSÃO $\lambda_{gt11}$ .....	55
4.2.1	OBTENÇÃO DO INSERTO DE TESA-1 PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	56
4.2.2	SUBCLONAGEM DO INSERTO DE TESA-1 EM VETOR DE SEQUENCIAMENTO.....	57
4.2.3	SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO DNA DO INSERTO DO CLONE RECOMBINANTE TESA-1.....	58
4.2.4	ANÁLISE COMPARATIVA DA SEQUÊNCIA DO TESA-1.....	58
4.2.5	SUBCLONAGEM DO INSERTO RECOMBINANTE EM VETOR DE EXPRESSÃO pGEX.....	60
4.2.6	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TESA-1, PRODUZIDA EM <i>E. COLI</i> PELA EXPRESSÃO EM pGEX-TESA-1, POR AFINIDADE À GLUTATIONA-AGAROSE 4B.....	61
4.2.7	EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO RECOMBINANTE TESA-1 NAS DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS E NA FRAÇÃO TESA DE VÁRIAS CEPAS DO <i>T. CRUZI</i> .....	62
4.2.8	ANÁLISE POR IMMUNOBLOTTING, DA EFICIÊNCIA DIAGNÓSTICA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TESA-1 NA DOENÇA DE CHAGAS.....	65
4.3	ISOLAMENTO DE CLONES RECOMBINANTES SELECIONADOS POR SONDA RADIOATIVA DA BIBLIOTECA DE cDNA DO <i>T. CRUZI</i> , CONSTRUÍDA EM $\lambda$ ZAP.....	67
4.3.1	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DOS CLONES RECOMBINANTES SELECIONADOS COM A SONDA DO TESA-1.....	69
4.4	ISOLAMENTO DE CLONES RECOMBINANTES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS EXCRETADAS-SECRETADAS DO <i>T. CRUZI</i> DE UMA BIBLIOTECA EM $\lambda$ ZAP SELECIONADA COM ANTICORPOS ANTI-TESA.....	70
4.4.1	CARACTERÍSTICAS DAS SEQUÊNCIAS DOS CLONES RECOMBINANTES OBTIDOS NO TERCEIRO ISOLAMENTO COM POTENCIAL DIAGNÓSTICO.....	76
4.5	REATIVIDADE IMUNOLÓGICA DOS CLONES RECOMBINANTES SELECIONADOS DAS BIBLIOTECAS DE DNA GENÔMICO E DE cDNA DO <i>T. CRUZI</i> COM ANTICORPOS ANTI-TESA E COM A SONDA DO TESA-1.....	83
5.	DISCUSSÃO.....	88
6.	CONCLUSÕES.....	100
7.	RESUMO.....	102
8.	ABSTRACT.....	104
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
10.	ANEXOS.....	127

## 1. Introdução

### 1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, causada pelo *T. cruzi* (*Trypanosoma cruzi*), só existe no Continente Americano, distribuída geograficamente desde o México até o sul da Argentina. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 16-18 milhões de pessoas se encontram infectadas pelo *T. cruzi* e aproximadamente, outras 100 milhões que vivem em áreas endêmicas estão sujeitas a contrair a doença (WHO, 1991; Moncayo, 1999).

*T. cruzi* é um parasita protozoário flagelado transmitido principalmente, pelas fezes e urina de vetores triatomíneos contaminados ou por transfusão sanguínea e, mais raramente, por transmissão congênita.

Atualmente, a interrupção da transmissão vetorial permanece sob controle em vários países do Continente Americano (Argentina, Uruguai e Paraguai), tendo conseguido a erradicação de vetores em outros (Brasil e Chile) (Moncayo, 1999; Dias & Schofield, 1999).

Entretanto, face à inexistência de vacinas e de drogas apropriadas para tratamento em larga escala, as pessoas infectadas, ainda permanecem como fonte de risco da transmissão, por via transfusional. Em vista do constante movimento migratório rural/urbano, o controle da transmissão do *T. cruzi* por transfusão sanguínea continua em estado de alerta. Como medida de controle, a triagem sorológica de amostras de doadores em bancos de sangue, faz-se necessária, para a prevenção do surgimento de novos casos (Schmunis, 1991; Salles, 1996; Umezawa et al., 2001b).

*T. cruzi* é encontrado no hospedeiro vertebrado como formas tripomastigota e amastigota. As formas tripomastigotas metacíclicas, presentes nas fezes e urina do vetor triatomíneo, infectam o hospedeiro através da mucosa íntegra ou pele lesada. Após invadir as células do hospedeiro, os tripomastigotas diferenciam-se em formas amastigotas e se multiplicam por divisão binária. Depois de várias replicações, as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas e migram para a corrente sanguínea, invadindo outras células (Brener, 1992).

A doença de Chagas apresenta, clinicamente, duas fases distintas:

Fase aguda - inicia uma semana após a infecção, podendo alguns pacientes (cerca de 3%) apresentar sinais clínicos característicos como: febre, aumento de linfonodos, edema palpebral unilateral (sinal de Romaña no local da infecção). Nesta fase, os parasitas circulantes são facilmente identificados e a detecção de anticorpos IgM caracteriza a fase aguda da doença.

Fase crônica – inicia-se dois a três meses após a infecção. Nesta fase é mais difícil a detecção de parasitas circulantes. Por isso, o diagnóstico de escolha é a detecção de anticorpos IgG anti-*T.cruzi*, pelas técnicas sorológicas convencionais.

Segundo as características clínicas, a fase crônica é subdividida em formas: indeterminada, cardíaca e digestiva.

Forma Indeterminada – ocorre em 60-70% dos pacientes chagásicos crônicos, sem sintomatologia clínica aparente, que podem evoluir para outras formas da infecção.

Forma Cardíaca - abrange 30-40% das infecções crônicas em adultos que podem apresentar desde arritmias, disfunções cardíacas, anormalidades no eletrocardiograma ou até cardiomiopatias.

Forma Digestiva – ocorre em cerca de 10% dos casos chagásicos, geralmente por acometimento do megacolon e megaesôfago, que causa disfagia nos pacientes. Pode ocorrer nos pacientes associada à forma cardíaca.

A resposta humoral da doença de Chagas é caracterizada pelo aparecimento cronológico de classes específicas de anticorpos durante o desenvolvimento da infecção. Os anticorpos específicos da classe IgM, que estão presentes na fase aguda da doença (Camargo & Amato-Neto, 1974; Camargo, 1992), ocorrem simultaneamente com o aumento de anticorpos específicos da classe IgA (Schmunis et al., 1978; Primavera et al., 1988; Reyes et al., 1990; Matsumoto et al., 1993; Lorca et al., 1995; Umezawa et al., 1996a). Os anticorpos da classe IgG, presentes desde a fase aguda, acompanham a infecção durante a fase crônica da doença (Camargo, 1992). Os anticorpos IgM específicos também podem ser encontrados nas infecções congênitas (Camargo & Amato-Neto, 1974).

O tratamento da doença de Chagas é realizado em pacientes diagnosticados como sendo de fase aguda, em profissionais acidentados e em

imunossuprimidos (por infecção HIV ou transplante de órgãos, susceptíveis de reativações). Atualmente, o tratamento também é administrado em crianças e adultos jovens que se encontram na forma indeterminada ou cardíaca da doença de Chagas (Rassi & Luquetti, 1992).

As drogas disponíveis para o tratamento: nifurtimox (Lampit, Bayer) e benznidazole (Rochagan, Roche) possuem eficácia duvidosa. Fato este, que pode estar relacionado à susceptibilidade variável das cepas encontradas em diferentes áreas geográficas. Aliado a este fato, os medicamentos apresentam alta toxicidade, podendo causar desde náuseas e vômitos, até hipoplasia da medula óssea, dermatite e polineurite (Dias & Schofield, 1999).

## 1.2 Diagnóstico sorológico da Doença de Chagas

O diagnóstico da doença de Chagas é realizado por testes sorológicos. Atualmente, os testes mais comumente empregados são: Imunofluorescência indireta (IFI), Hemaglutinação indireta (HAI) e ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). O diagnóstico sorológico fornece suporte, tanto para corroborar dados clínicos, como para triagem de doadores em banco de sangue e avaliação de estudos epidemiológicos.

Na triagem sorológica da doença de Chagas, em doadores de bancos de sangue, é obrigatório utilizar-se de pelo menos duas metodologias ou preparações antigênicas diferentes (WHO, 1991). Usualmente uma terceira metodologia é realizada para a confirmação do diagnóstico, visto que as técnicas disponíveis no mercado, não raramente, fornecem resultados inconclusivos (Oelemann et al. 1999a; Saez-Alquézar et al., 2000).

A reação de IFI para a doença de Chagas foi descrita por Camargo et al. (1966). Na reação de IFI são utilizadas formas epimastigotas do *T. cruzi* formolizadas e fixadas em lâminas. Pela técnica original, o soro do paciente era diluído a 1/10 e depois revelado com anti- $\gamma$ globulina humana conjugada com isotiocianato de fluoresceína. Atualmente o conjugado foi substituído por outros com anticorpos de cadeia específica para classes IgG e IgM, que eliminam ligações inespecíficas. Camargo & Amato-Neto (1974) descreveram a reação de IFI-IgM para o diagnóstico da infecção chagásica aguda utilizando conjugados específicos. Desde então, o teste de IFI-IgM foi rapidamente

introduzido para a detecção de anticorpos IgM nos soros de pacientes com infecção chagásica aguda e congênita. Nas infecções congênitas, a absorção prévia do soro com fator reumatóide, evita a interferência deste fator, frequentemente presente em diversas patologias do recém-nascido.

A reação de HAI foi inicialmente descrita por Cerisola et al. (1962). Posteriormente, modificações foram introduzidas, como a utilização de um reagente estável de hemaglutinação com antígenos polissacarídicos (Hoshino-Shimizu et al., 1978) que permitiu, também, a detecção de infecções mais recentes da doença de Chagas. O antígeno foi preparado de formas epimastigotas do *T. cruzi*, submetidas a uma hidrólise alcalina (NaOH 0,15M) e posterior neutralização (HCl 0,15 M).

A partir da descrição de Voller et al. (1975), a técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) foi padronizada com extratos de formas epimastigotas, submetidas ao tratamento alcalino, descrito por Hoshino-Shimizu et al., (1978) para o diagnóstico da doença de Chagas. Vários outros ensaios de ELISA foram descritos, utilizando antígenos purificados do *T. cruzi*, como GP90 kDa, GP25 kDa, GP72 kDa (Schechter et al., 1985; Scharfstein et al., 1985 e Schechter et al., 1986). Mais recentemente, antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos, também foram avaliados por ELISA em estudos multi-cêntricos (Moncayo & Luquetti, 1990; Umezawa et al., 1999a).

### 1.2.1 Desempenho diagnóstico

Os métodos sorológicos convencionais, empregados atualmente na doença de Chagas, utilizam o parasita íntegro, extrato total ou proteínas purificadas de formas epimastigotas do *T. cruzi*, formas não infectantes, facilmente obtidas em meios de cultura líquidos.

Embora, altamente complexas, estas preparações antigênicas provenientes de formas epimastigotas fornecem alta sensibilidade no diagnóstico sorológico de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Todavia, a especificidade é comprometida pela grande heterogeneidade de moléculas presentes nestes extratos, que propiciam à ocorrência de reações falso-positivas. Esta reatividade cruzada pode ocorrer com anticorpos presentes em soros de pacientes com outras moléstias ou infecções,

principalmente daqueles com leishmaniose visceral (Chiller et al., 1990; Schattchneider et al., 1992; Matsumoto et al., 1993; Velásquez, et al., 1993; Umezawa et al., 2001a).

O diagnóstico sorológico efetuado com os testes convencionais pode resultar em casos inconclusivos ou duvidosos, fato comum na triagem de doadores em bancos de sangue. Estes resultados contraditórios geram anualmente um descarte de 3,7% das bolsas de sangue, por falta de um teste confirmatório eficaz (Salles et al., 1996; Oelemann, et al., 1999b; Saez-Alquezar et al., 2000).

Os testes sorológicos convencionais podem fornecer também resultados falso-negativos, principalmente no diagnóstico de recém-nascidos de mães chagásicas e de pacientes de fase aguda (Lorca et al.; 1995; Umezawa et al., 1996b). Este fato pode decorrer da ausência de epítomos específicos em formas epimastigotas capazes de detectar a infecção chagásica aguda.

Vários autores mostraram que na fase inicial da infecção, os anticorpos precocemente produzidos reagem principalmente com epítomos localizados na superfície de formas tripomastigotas, os quais não são compartilhados pelas duas formas do *T. cruzi* (Affranchino et al., 1989; Gonçalves et al., 1991; Umezawa et al., 1996b, Umezawa et al., 2001a).

Estudos realizados com antígenos purificados de formas epimastigotas do *T. cruzi*, com a finalidade de melhorar a especificidade da sorologia da doença de Chagas, não forneceram desempenho diagnóstico satisfatório (Solana et al., 1995; Teixeira et al., 1994). Além disso, as preparações antigênicas provenientes de formas epimastigotas não permitem o diagnóstico diferencial entre fases da infecção, ou formas clínicas da doença de Chagas.

A principal dificuldade dos testes convencionais, utilizados no diagnóstico da doença de Chagas, tem sido a sua incapacidade em monitorar e diagnosticar cura nos pacientes submetidos ao tratamento específico. Os pacientes chagásicos tratados apresentam anticorpos detectados pela sorologia convencional, mesmo na ausência de parasitas no sangue (Krettli 1999; Luquetti, 1997).

Poucos estudos relatam a eficiência de antígenos purificados de formas epimastigotas como eficientes na discriminação de pacientes chagásicos curados dos não curados. Gazzinelli et al. (1993) utilizaram uma

proteína, identificada como sendo uma cisteíno-proteinase (GP 57/51), isolada de formas epimastigotas, capaz de discriminar pacientes tratados e curados daqueles não curados. Esta cisteíno-proteinase também foi encontrada na superfície de tripomastigotas do *T. cruzi*, como uma proteína presente na fração de exoantígenos (Murta et al., 1990).

Estes resultados motivaram diversos grupos (Krettli & Brener, 1982a; Umezawa et al., 1993; Krautz et al., 1994; Levy et al., 1996), a identificar em antígenos de formas tripomastigotas do *T. cruzi*, epítomos que poderiam auxiliar no monitoramento da cura de pacientes chagásicos submetidos à quimioterapia anti-*T. cruzi*.

### 1.3 Antígenos alvos de anticorpos líticos

As formas tripomastigotas, mas não as epimastigotas do *T. cruzi*, são resistentes aos efeitos líticos do complemento. Um fenômeno provavelmente desenvolvido, para aumentar a infectividade e sobrevivência do parasita no hospedeiro. Em contrapartida, o hospedeiro produz anticorpos específicos denominados de líticos, que são capazes de aglutinar e converter os tripomastigotas, em alvos potenciais à lise desencadeada pelo sistema complemento (Krettli & Brener, 1982a; Norris et al., 1997; Krautz, et al., 2000).

Os anticorpos líticos atuam promovendo a lise de tripomastigotas tanto pelas vias alternativa como clássica do complemento e, estão associados à presença do *T. cruzi* no hospedeiro. A detecção de anticorpos líticos se faz pela técnica denominada de lise mediada por complemento (LMC), através da lise de formas tripomastigotas vivas mediada pelo complemento.

Pacientes chagásicos submetidos à quimioterapia bem sucedida podem apresentar anticorpos detectados pelos testes convencionais, parasitemia negativa e ausência de anticorpos líticos (Krettli, et al., 1982b; Almeida, et al., 1993; Krautz, et al., 2000).

Esta dissociação existente, entre os anticorpos detectados pela sorologia convencional e os responsáveis pela resistência à infecção ativa, foi descrita inicialmente por Krettli & Brener (1982a). O monitoramento da cura parasitológica pela LMC, em pacientes chagásicos submetidos ao tratamento

específico, mostra que pacientes curados não possuem anticorpos líticos (Krettli et al, 1982b; Krettli et al, 1984).

A indução de anticorpos líticos à lise de tripomastigotas vivos, mediada por complemento, no teste de LMC, foi comprovada por Kipnis et al. (1985) que demonstraram que fragmentos Fab e não de Fc de moléculas de IgG ligados especificamente à superfície do parasita, foram responsáveis pela LMC.

No entanto, a abrangência da LMC é questionada por vários grupos, e há relatos de que nem todos os isolados do *T. cruzi* induzem a produção de anticorpos líticos (Muller et al., 1986), além das dificuldades metodológicas encontradas por outros grupos (Pereira et al., 1989; Levy et al., 1996). Estes fatos justificam a necessidade de se encontrar novos antígenos aliados a outros testes que possam monitorar a cura em pacientes tratados (Gazzinelli et al., 1988; Almeida et al., 1997; Norris et al., 1994b; Krautz et al., 1995; Levy et al., 1996).

A literatura mostra que a capacidade lítica dos anticorpos, para indução da lise mediada por complemento, está relacionada com a presença de moléculas localizadas na superfície de tripomastigotas vivos, que atuariam provavelmente como antígeno alvo destes anticorpos (Martins et al., 1985; Norris et al., 1991; Krautz et al., 2000).

O primeiro alvo potencial para os anticorpos líticos foi identificado por Martins et al. (1985), que descreveu como sendo o de uma glicoproteína de 160 kDa, presente na superfície de formas tripomastigotas. Este antígeno foi reconhecido somente por anticorpos presentes em animais ou humanos com infecção chagásica ativa, pela reação de imunoprecipitação utilizando tripomastigotas marcados com [<sup>35</sup>S]metionina.

Posteriormente, Norris et al. (1989) descreveram uma proteína com PM de 160 kDa, que induzia a produção de anticorpos *in vivo*, capazes de lisar tripomastigotas na presença de complemento.

A purificação dessa proteína, de membranas de formas tripomastigotas, por uma coluna de afinidade de C3b, revelou que ela é uma glicoproteína ligada à membrana por uma âncora de GPI (glicosil fosfatidil inositol), semelhante a uma outra proteína denominada de DAF (decay accelerating factor). O DAF é uma proteína regulatória do complemento humano que interfere na formação e aceleração do decaimento intrínseco da C3 convertase do complemento (Norris et al., 1991).



A glicoproteína de 160 kDa, denominada de proteína regulatória do complemento (CRP), apresentou afinidades com C3b e C4b, demonstrando capacidade inibitória na formação da C3 convertase, mediada tanto pelas vias alternativa, como clássica do complemento (Norris & Schimpf, 1994).

Uma avaliação efetuada com a CRP purificada demonstrou que esta molécula é reconhecida preferencialmente por anticorpos de pacientes chagásicos não curados (com infecção ativa). Os anticorpos de pacientes curados, mas com sorologia positiva pelos testes convencionais, mostraram-se incapazes de reagir com a CRP (Norris et al, 1994).

Mais recentemente, Norris (1998) demonstrou que formas epimastigotas transfectadas com o vetor de expressão do *T. cruzi* carregando o cDNA da CRP de tripomastigota, tornaram-se resistentes à ação lítica do complemento e capazes de produzir uma CRP funcional, apresentando afinidade de ligação com C3b.

Outra glicoproteína com atividade regulatória do complemento encontrada em tripomastigotas, foi descrita como sendo a T-DAF. Esta glicoproteína (PM de 87-93 kDa) mostrou capacidade funcional de induzir à ação de anticorpos líticos tanto pelas vias alternativa como clássica do complemento, semelhantemente a CRP (160 kDa) e ao DAF humano (Joiner et al, 1988; Rimoldi et al., 1988; Tambourgi et al., 1993; Krautz et al., 2000).

A glicoproteína gp 58/68 do *T. cruzi*, descrita por Fischer et al. (1988), demonstrou atividade regulatória do complemento capaz de inibir somente a C3 convertase da via alternativa do complemento, por interagir melhor com o fator B do que com C3b durante a formação da C3 convertase.

A proteína recombinante de 24 kDa do *T. cruzi* (Tc24) que se liga ao  $Ca^{2+}$ , também foi descrita como sendo alvo de anticorpos líticos (Krautz, et al., 2000). O recombinante Tc24 apresentou altos índices de sensibilidade quando avaliado com soros de pacientes chagásicos não tratados e foi descrito como sendo capaz de monitorar cura na maioria dos pacientes chagásicos submetidos ao tratamento na fase crônica da doença de Chagas (Krautz et al., 1995, Estani et al., 1998). Todavia, esta proteína recombinante, descrita como antígeno 1F8, por Umezawa et al., (1999a), não foi reconhecida por todos os soros de pacientes chagásicos, questionando-se sua utilidade no monitoramento terapêutico da cura de pacientes chagásicos.

Um glicoconjugado contendo epítomos  $\alpha$ -galactosil foi reconhecido por anticorpos líticos anti- $\alpha$ -galactosil presentes em pacientes chagásicos crônicos. Esta molécula de 74 kDa, purificada de formas tripomastigotas, mostrou capacidade de discriminar pacientes chagásicos curados daqueles não curados (Almeida et al., 1993). Além disso, a avaliação desta molécula, para o imunodiagnóstico da doença de Chagas, apresentou 100% de sensibilidade e especificidade. Porém, a obtenção laboriosa e pouco rentável desta molécula, aliada à necessidade de amplificação da reação enzimática, por quimioluminescência, limita sua utilização rotineira (Almeida et al., 1997).

#### **1.4 Exo-antígenos do *Trypanosoma cruzi***

As formas tripomastigotas, formas infectantes do *T. cruzi*, possuem várias moléculas de superfície que são excretadas-secretadas, de maneira espontânea e contínua pelo parasita.

Moléculas liberadas como exo-antígenos das formas infectantes do *T. cruzi* foram identificadas por vários autores (Gonçalves et al., 1991, Corral et al., 1992; Grijalva et al., 1999) e algumas delas se encontram caracterizadas.

Algumas dessas moléculas, como o polipeptídeo de 85 kDa presente também em soros de pacientes chagásicos, foi descrito como um receptor para fibronectina/colágeno, importante no processo de adesão/penetração das formas infectantes nas células hospedeiras (Ouaisi et al., 1986; Ouaisi et al., 1990). Outro antígeno identificado como Tc-85, que se liga a laminina de camundongo, (Giordano et al., 1994) foi considerado majoritário dentre os exo-antígenos liberados por formas tripomastigotas de quatro diferentes cepas do *T. cruzi* (Gonçalves, et al., 1991).

Moléculas com outras funções são também ativamente liberadas pelo parasita, como proteases (Yokoyama-Yasunaka et al., 1994; Santana et al., 1997), mucinas (Schenkman et al., 1993) e proteína C-reativa (Coutinho et al., 1998).

Moléculas já citadas acima como alvos de anticorpos líticos, liberadas da superfície de formas tripomastigotas, como a glicoproteína T-DAF de 87-93 kDa (Joiner et al., 1988) e a proteína regulatória do

complemento (CRP) de 160 kDa (Norris et al., 1991), foram purificadas da fração de exo-antígenos.

Outra molécula de 160 kDa, como a FL-160 (Van Voorhis & Eisen, 1989), descrita como sendo uma proteína de superfície de tripomastigotas associada ao flagelo, é reconhecida por anticorpos de pacientes chagásicos de fase crônica. Uma seqüência homóloga a este epítipo está presente em tecido nervoso humano, reforçando a teoria autoimune da doença de Chagas (Van Voorhis et al., 1991; Van Voorhis et al., 1993; Van Voorhis et al., 1995).

Uma terceira molécula de 160 kDa, denominada de Chronic Exoantigen (CEA), foi identificada no sobrenadante de cultura celular infectada com *T. cruzi*. Esta molécula foi reconhecida somente por soros de pacientes de fase crônica e não de fase aguda da infecção chagásica (Jazin et al., 1991).

Outro antígeno liberado no sobrenadante de culturas do *T. cruzi* foi denominado de “shed acute phase antigen” (SAPA), por ser detectado precocemente nos soros de pacientes de fase aguda (Affranchino et al., 1989). Apesar de SAPA ser extremamente útil na identificação de infecções mais recentes da doença de Chagas, posteriormente foi reconhecido também por anticorpos de pacientes de fase crônica (Vergara et al., 1992) e de animais experimentalmente infectados com o *T. cruzi* (Leguizamón et al., 1991).

Alguns estudos, realizados para avaliar o potencial diagnóstico dos exo-antígenos liberados no sobrenadante de culturas de células infectadas com *T. cruzi*, mostraram-se promissores. A utilização desta fração antigênica por “Immunoblotting” mostrou que os antígenos de 160 kDa e SAPA foram alvos imunodominantes do reconhecimento dos anticorpos presentes nos soros de pacientes chagásicos (Umezawa et al., 1996b; Umezawa et al., 2001a; Nakazawa et al., 2001).

Os estudos de Umezawa et al. (1996b) utilizando antígenos excretados e secretados de formas tripomastigotas do *T. cruzi* (TESA), para avaliar 512 amostras de soros de pacientes chagásicos e não chagásicos por “Immunoblotting” (TESA-blot), alcançaram máxima sensibilidade e especificidade diagnóstica. O TESA-blot mostrou ser um excelente teste confirmatório, capaz de detectar tanto casos crônicos, como agudos ou congênitos de pacientes com suspeita clínica da doença de Chagas. Além

disso, possibilitou o diagnóstico de casos inconclusivos obtidos pela sorologia convencional.

Nesta avaliação, o reconhecimento diferencial de soros chagásicos por dois antígenos presentes na fração TESA, permitiu a discriminação das fases da infecção chagásica. O primeiro deles, descrito como SAPA (Affranchino et al. 1989), reagiu preferencialmente com anticorpos de pacientes com infecção chagásica aguda, que reconheceram polipeptídeos compreendidos entre 130-200 kDa. O outro antígeno, de 150-160 kDa, foi reconhecido por todos os soros de pacientes chagásicos crônicos.

Posteriormente, Umezawa et al. (2001a) empregaram a fração TESA para avaliar 284 soros de pacientes chagásicos e não chagásicos por ELISA. O TESA-ELISA apresentou máxima sensibilidade diagnóstica para detectar tanto casos agudos como crônicos da doença de Chagas. Um ensaio de competição entre TESA-ELISA e EAE-ELISA (extrato total alcalino de epimastigotas) mostrou que pacientes chagásicos crônicos possuem anticorpos distintos reconhecendo especificamente as diferentes formas evolutivas (epimastigota e tripomastigota) do *T. cruzi*. Estes resultados confirmaram dados previamente obtidos por outros pesquisadores (Krettli, 1999).

Resultados de máxima especificidade e sensibilidade também foram obtidos por Nakazawa et al. (2001), quando TESA foi utilizado para avaliar 76 soros por TESA-blot e 360 soros por TESA-ELISA, para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Adicionalmente, os autores encontraram eficiência diagnóstica semelhante, utilizando TESA proveniente de cepas com biotipos distintos do *T. cruzi*: I(Y), II(WSL), III(12SF) e IV (cepa colombiana).

#### **1.4.1 Família Trans-sialidase do *Trypanosoma cruzi***

Nas últimas décadas, clones recombinantes expressando antígenos de diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* foram isolados de bibliotecas de expressão de DNA do *T. cruzi*, selecionadas com soros de animais infectados ou de pacientes com doença de Chagas. As bibliotecas foram construídas em vetores  $\lambda$ gt11 ou  $\lambda$ ZAP, empregando DNA genômico ou cDNA de epimastigotas ou tripomastigotas do *T. cruzi* (Ibañez et al, 1987; Ibañez et al.,

1988; Affranchino, et al., 1989; Frasch & Reyes, 1990; Frasch et al., 1991; Franco da Silveira, 1992; Franco da Silveira et al., 2001).

Vários desses clones recombinantes isolados codificam proteínas do *T. cruzi* reconhecidas por soros de pacientes com doença de Chagas. Muitos destes genes foram isolados por diferentes grupos de pesquisadores, recebendo várias denominações (Frasch et al., 1991; Franco da Silveira et al., 2001).

O seqüenciamento gênico tornou possível a identificação de vários desses genes dentro de uma família denominada de "Super Família Trans-sialidase do *T. cruzi*".

O estudo da família Trans-sialidase iniciou-se com a descrição da atividade de neuraminidase em *T. cruzi* por Pereira (1983). Anos mais tarde, os trabalhos de Previato (1985) e Zingales (1987) levaram então à descoberta da atividade de trans-sialidase nesses parasitas, considerada mais tarde, como similar à da enzima neuraminidase (Schenkman et al., 1992).

Paralelamente, ficou claro que as enzimas neuraminidase/trans-sialidase eram similares ao SAPA, também estudada por outros autores (De Titto & Araújo, 1987; Reyes et al., 1990; Pollevick et al., 1991; Jazin et al., 1991; Cross & Takle, 1993; Leguizamón et al., 1994a; Leguizamón et al., 1994b; Frasch, 1994; Schenkman et al., 1994).

Dados semelhantes observados com os genes FL-160, CRP e CEA, que codificam proteínas de 160 kDa, mostraram também que todas essas moléculas pertenciam à "Super Família Trans-sialidase". A análise comparativa entre seqüências de nucleotídeos das moléculas de 160 kDa apresentou uma homologia parcial entre CEA e FL-160, assim como, entre as seqüências de FL-160 e CEA com a CRP de 160 kDa (Van Voorhis et al., 1993; Jazin et al., 1995; Norris et al., 1997).

Nas revisões sobre seqüências de antígenos recombinantes do *T. cruzi*, estabeleceu-se o agrupamento dos membros da família Trans-sialidase em 4 grupos, baseado na similaridade (60-70% intra-grupos e 30-40% inter-grupos) da seqüência gênica das moléculas (Cazzulo & Frasch, 1992; Campetella et al., 1992; Schenkman & Eichinger, 1993; Colli, 1993; Cross & Takle, 1993; Schenkman et al., 1994).

A família Trans-sialidase é constituída por quase 1000 membros (Salazar et al., 1996) que apresentam:

- 1) Uma seqüência contendo os aminoácidos VTVxNVxLYNR, similar a da fibronectina tipo 3 (Fn3), com função presumivelmente de adesão,
- 2) Uma seqüência carboxi-terminal hidrofóbica, compatível com função de âncora, que facilitaria a liberação da molécula.

As principais características que permitiram a distribuição dos membros desta família em 4 grupos foram:

**Grupo I:** Presença de três domínios **SxDxGxTW (Asp-Boxes)** com seqüências similares à da neuraminidase bacteriana (NA-bac). Uma região C-terminal com domínios repetitivos longos (12 aminoácidos), perfazendo 50% das moléculas. Incluem, a trans-sialidase/neuraminidase (TCTS/TCNA), que possuem um sítio com atividade enzimática (AE) na região N-terminal. Inclui também a molécula SAPA, que tem 93% de similaridade em aminoácidos com a TCTS/TCNA, mas não apresenta AE (Campetella et al., 1992; Schenkman & Eichinger 1993; Cross & Takle 1993; Schenkman et al., 1994).

**Grupo II:** Presença de até dois domínios **SxDxGxTW** similares à da NA-bac. Não apresentam regiões repetitivas ou são poucas e curtas, sem AE. Incluem as GP85 (como a Tc85), a TSA-1, a GP82, a Tt34c1, a GP90, a T-DAF e as ASP1 e ASP2 expressas em amastigotas. Além da SA85-1, constituída por mais de 100 genes expressos por tripomastigotas e amastigotas que podem apresentar 70-80% de homologia em aminoácidos (Millar et al., 1999; Campetella et al., 1992; Schenkman & Eichinger 1993; Cross & Takle 1993; Schenkman et al., 1994).

**Grupo III:** Domínio, similar à da NA-bac, se encontra degenerado ou ausente. Não apresentam regiões repetitivas e nem AE. Apresentam alta homologia com membros do grupo II. Incluem as proteínas de 160 kDa: CEA, CRP, além da FL-160 expressa no bolso flagelar. As proteínas do tipo FL-160 são codificadas por mais de 750 genes expressos por tripomastigotas. Anticorpos anti-FL-160 também reconhecem amastigotas, por IFI. Inclui também como membro, um pseudo-gene da GP-85 (c1821). (Van Voorhis et al., 1993; Cross & Takle 1993; Schenkman et al., 1994; Salazar et al., 1996; Millar et al., 1999).

**Grupo IV:** Ausência de domínios similares à NA-bac e homologia restrita com os demais grupos. Alguns membros apresentam muitas regiões repetitivas curtas (EPKSA) que podem diferir em um ou mais aminoácidos. Incluem a Tc 13 e Tc 13.1, além da Tc 13.N5 que não possui regiões repetitivas (Campetella et al., 1992).

As principais funções atribuídas às moléculas da família Trans-sialidase descrita nas revisões acima citadas foram:

- 1) adesão e/ou penetração celular das formas tripomastigotas,
- 2) auxílio no escape dessas formas do fagossoma e/ou da célula hospedeira,
- 3) prevenção à lise mediada pelo complemento,
- 4) função de proteção à resposta do sistema imune, explicada pela presença de epítomos altamente imunogênicos e repetitivos que mascarariam epítomos protetores (Wrightsmann et al., 1994).

A função de proteção é reforçada pela teoria *altered peptide ligands*, descrita na malária humana por Gilbert et al. (1998), que consiste da troca de aminoácidos localizados no epítomo para célula T, gerando epítomos alterados que atuam diminuindo a eficiência desta resposta. Esta função de evasão do *T. cruzi* foi demonstrada por Millar et al., (1999). Estes autores verificaram que durante uma infecção do *T. cruzi*, uma expressão simultânea de múltiplos membros da proteína de superfície SA85-1 (Grupo II) estimula uma resposta CD4 potencialmente protetora que se torna anérgica, provavelmente, em função da indução da expressão de epítomos alterados desta proteína. Esta expressão simultânea de epítomos similares alterados da proteína SA85-1 por um mesmo parasita foi confirmada por Kahn et al. (1999) utilizando anticorpos monoclonais específicos para esta proteína.

Foi demonstrado também que o antígeno da superfície de tripomastigota TSA-1 e moléculas da superfície de amastigotas ASP-1 e ASP-2, pertencentes ao Grupo II da família Trans-sialidase, parecem desempenhar importante papel na patogenia da doença de Chagas, como alvos de linfócitos T citotóxicos, CD8+ de animais infectados com *T. cruzi* e de pacientes chagásicos (Low et al., 1998; Wisel et al., 1998). Além disso, foi descrita indução de apoptose em células do sistema imune pela trans-sialidase (Leguizamón et al., 1999).

### 1.4.2 Antígenos recombinantes no diagnóstico sorológico

Muitos clones recombinantes isolados de bibliotecas do *T. cruzi* expressam antígenos relevantes para sorodiagnóstico. A maioria destes antígenos foi expresso por genes com sequências de nucleotídeos semelhantes, mas apresentando denominações diversas atribuídas por diferentes pesquisadores que obtiveram o isolamento gênico (Frasch et al., 1991; Franco da Silveira et al., 2001).

Os antígenos, semelhantes entre si, relacionados sequencialmente com as respectivas unidades repetitivas entre parênteses foram: CRA, Ag30, JL8 e TCR27 (14); FRA, Ag1, JL7, H49 (68); B13, Ag2, TCR39, PEP-2 (12); Ag36, JL9, MAP (38); SAPA, TCNA, TS (12); Ag13, TcD (5); B12 (20) e TcE (7) (Ibañez et al., 1987; Ibañez et al., 1988; Affranchino, et al., 1989; Lafaille et al., 1989; Hoft et al., 1989; Levin et al., 1989; Frasch & Reyes, 1990; Cotrim et al., 1990; Frasch et al., 1991; Burns, et al., 1992; Gruber & Zingales, 1993; Peralta et al., 1994; Houghton et al., 1999; Franco da Silveira et al., 2001).

Uma alta frequência de antígenos isolados, apresentando domínios repetitivos em suas sequências gênicas, parece indicar alta concentração ou alta afinidade de anticorpos dirigidos a estes epítopos, presentes no soro de pacientes chagásicos. Todavia, os soros de pacientes chagásicos foram, ainda, capazes de reconhecer vários antígenos sem unidades repetitivas identificados como: JL5; 24 kDa(FcaBP, 1F8, Tc-24); Tc-28; A13; Tc40; hsp(cy-hsp70, mt-hsp70, grp-hsp78); 160kDa(FL-160, CEA, CRP); SA85-1.1 e ubiquitina (Paranhos et al., 1990; Frasch et al., 1991; Cetron et al., 1992; Abate et al., 1993; Jazin et al., 1995; Krautz et al., 1995; Lesenechal et al., 1997; Norris et al., 1997; Krautz et al., 1998; Telles, et al.; 1999).

Muitos dos antígenos recombinantes, acima descritos, mostraram-se capazes de solucionar algumas das dificuldades anteriormente apontadas no diagnóstico da doença de Chagas (Moncayo & Luquetti, 1990; Levin et al., 1991; Umezawa et al., 1999a).

Primeiramente, o potencial sorodiagnóstico de 17 destes antígenos recombinantes do *T. cruzi* foi estudado por três diferentes multi-centros.



O primeiro estudo, supervisionado pela OMS, avaliou 50 soros de pacientes chagásicos e não chagásicos que apresentaram índice kappa (KI)  $\geq 0,80$ , especificidade de 0,86-1,00 e sensibilidade de 0,95-1,00, em 10 dos 17 antígenos testados. Os resultados obtidos com o antígeno CRA mostraram melhores índices de concordância (KI=1,00), seguido do B13 (KI=0,96) e do H49 (KI=0,92) (Moncayo & Luquetti, 1990).

No segundo estudo, coordenado pela organização de biotecnologia para desenvolvimento da ciência e tecnologia (CYTED), 10 antígenos recombinantes (Ag2, Ag13, SAPA, H49, A13, JL5, JL7, JL8, JL9 e RAI) foram testados por Dot-blot. A detecção de anticorpos realizada em 215 soros de pacientes chagásicos e não chagásicos, mostrou melhor concordância entre os resultados obtidos com os antígenos JL7, H49, Ag2 e A13, que apresentaram KI=0,82-0,93 (Levin et al., 1991).

No terceiro estudo, o desempenho diagnóstico de seis antígenos (H49, JL7, JL8, A13, B13 e 1F8), foi avaliado em 541 amostras de soros de pacientes chagásicos e não chagásicos, pela técnica de ELISA. Os antígenos 1F8, H49, JL7 e B13 obtiveram melhor desempenho, apresentando sensibilidade entre 93,4-99,9%. Ausência de reatividade cruzada foi observada em todos os recombinantes testados (Umezawa et al. 1999a).

Após estes estudos, vários pesquisadores alcançaram melhor desempenho diagnóstico empregando misturas de antígenos recombinantes nos testes sorológicos da doença de Chagas.

A mistura dos antígenos CRA e FRA, testada por ELISA, para avaliar 524 soros chagásicos e não chagásicos e 60 soros com resultados duvidosos obtidos pela sorologia convencional, apresentou 98,3% de sensibilidade e 100% de especificidade. A mistura CRA e FRA conseguiu reduzir 50% dos casos inconclusivos detectados pelos testes convencionais (Almeida et al., 1990; Carvalho et al., 1993).

Uma mistura de cinco recombinantes (Ag1, Ag2, Ag13, Ag30 e SAPA) utilizados em um ensaio de *Immunodot* (Dia Kit Bio-Chagas assay<sup>®</sup>, Gador, Buenos Aires, Argentina), para avaliar 995 soros de pacientes chagásicos e não chagásicos, mostrou 99,6% de sensibilidade e 99,1% de especificidade. Reações falso-positivas foram detectadas em 4 soros de pacientes com leishmaniose visceral (Pastini, et al., 1994).

A combinação dos antígenos hsp78(grp78) e FcaBp, foi testada por ELISA, para avaliar 176 soros chagásicos e não chagásicos. A avaliação mostrou que o uso individual do antígeno em relação à mistura, aumentou a sensibilidade de 90% para 97% e, elevou de 3% para 8%, a reatividade cruzada com soros de pacientes com leishmaniose cutânea (Krautz et al., 1998).

Uma mistura de recombinantes com peptídeos sintéticos (INNO-LIA® Chagas Ab, Innogenetics, Ghent, Belgium) foi testada em um ensaio imunológico, utilizando os antígenos (CRA, FRA, Ag39, TcD, Tc24, SAPA e MAP), dispostos linearmente em um suporte de nylon. A avaliação realizada em 1062 soros chagásicos e não chagásicos, mostrou 100% de sensibilidade e 99,3% de especificidade. Além disso, nenhuma reatividade cruzada foi encontrada com soros de pacientes com leishmaniose (Oelemann et al., 1999b; Saez-Alquezar et al., 2000).

Resultados similares aos obtidos com misturas de recombinantes foram observados com a utilização de peptídeos sintéticos derivados de sequências de antígenos recombinantes na sorologia da doença de Chagas.

Os peptídeos sintéticos derivados dos antígenos (Ag1, Ag2, Ag3, Ag30, Ag36 e SAPA) foram testados em ELISA e ensaios radiométricos. Os peptídeos derivados dos Ag2 e Ag36 reagiram respectivamente com 93% e 65% de um total de 60 soros de pacientes chagásicos testados. Aqueles peptídeos derivados dos antígenos Ag1, Ag13 e Ag30 mostraram pouca (44-65%) sensibilidade, quando comparada com o desempenho de todos os recombinantes (>90%) (Vergara et al., 1991; Vergara et al., 1992).

Os peptídeos sintéticos PEP-2 e TcD foram testados individualmente ou combinados pela técnica de ELISA. A utilização individual de TcD e PEP-2 na avaliação de 378 soros de pacientes chagásicos e não chagásicos, apresentaram respectivamente, 93% e 91% de sensibilidade. O uso combinado destes antígenos aumentou a sensibilidade para 99,7% e a especificidade para 99% (Peralta et al., 1994).

Também, os peptídeos Ag2, TcD e TcE foram empregados na técnica de ID-PaGLIA® (Diamed, Cressier sur Morat, Suíça), sensibilizados em partículas de gel coloridas, que se aglutinam na presença de anticorpos específicos, após centrifugação. A avaliação de 230 soros de pacientes

chagásicos e não chagásicos apresentou 96,8% de sensibilidade e 94,6% de especificidade (Rabello et al., 1999).

Além dos peptídeos sintéticos descritos acima, o avanço tecnológico possibilitou também uma avaliação de antígenos com multi-epítomos na sorologia da doença de Chagas.

Primeiramente, unidades repetitivas dos antígenos TcD, TcE e PEP-2 foram combinados linearmente para fornecer um antígeno multi-epítopo constituído por tripeptídeos sintéticos. A avaliação por ELISA deste multi-epítopo, com soros de pacientes chagásicos e não chagásicos, apresentou 99,6% de sensibilidade e 99,3% de especificidade (Houghton et al., 1999).

Posteriormente, outro antígeno multi-epítopo foi construído, adicionando-se o TcLo1.2, um peptídeo isolado de um soro de paciente sorologicamente negativo ao tripeptídeo. O antígeno multi-epítopo constituído por tetrapeptídeos apresentou sensibilidade máxima pela técnica de ELISA (Houghton et al., 2000).

Todos os estudos acima citados mostraram que o uso de antígenos recombinantes tanto em misturas ou em "spots" apresentou especificidade superior aos dos testes convencionais. Todavia, apesar da alta especificidade e sensibilidade apresentadas pelos antígenos testados, nenhum deles mostrou ser capaz de discriminar fases da doença de Chagas ou de monitorar cura em pacientes chagásicos tratados. Ademais, a introdução de misturas de peptídeos ou antígenos multi-epítomos no sorodiagnóstico da doença de Chagas pode ser conveniente, quando o determinante recombinante proposto demonstrar excelente desempenho diagnóstico, com a finalidade de possibilitar o aprimoramento da qualidade do teste.

### **1.5 Justificativa**

Os dados descritos acima esclarecem a necessidade de se pesquisar marcadores sorológicos que possam fornecer subsídios para atender as seguintes finalidades:

- a) Discriminar fases da doença de Chagas.
- b) Monitorar cura em pacientes submetidos ao tratamento específico da doença de Chagas.

Para encontrar possíveis marcadores foi empregada a tecnologia do DNA recombinante que permite a seleção de clones recombinantes de bibliotecas de DNA e cDNA do *T. cruzi* construídas em vetores de expressão.

Esta técnica possibilita posterior clonagem do fragmento gênico selecionado em vetores de expressão para produção de antígenos específicos do *T. cruzi* em *E. coli*, em quantidades ilimitadas. Além disso, fornece antígenos com elevado teor de pureza, eliminando eventuais problemas de contaminação com outros antígenos do parasita e proporcionando a obtenção de um produto homogêneo, estável e reprodutível, com características apropriadas para finalidades diagnósticas.

Com base nos resultados previamente obtidos por Umezawa et al. (1996a, 1996b, 2001a), as seleções foram focalizadas para genes expressando exo-antígenos das formas infectantes do *T. cruzi*.

Os resultados de Umezawa et al. (1996b) demonstraram que antígenos excretados-secretados pelas formas tripomastigotas (TESA), quando aplicados em immunoblotting (TESA-blot), permitem o diagnóstico diferencial da fase aguda e crônica da doença de Chagas.

O TESA, em sua forma nativa, é constituído majoritariamente por moléculas da Família Trans-sialidase, como a presença do antígeno SAPA (Affranchino et al., 1989), reconhecido preferencialmente por soros de fase aguda pelo TESA-blot. O TESA-blot identificou também, a presença constante de uma proteína com peso molecular de 150-160 kDa, que teve amplo reconhecimento dos anticorpos presentes na fase crônica. O desempenho diagnóstico do TESA-blot apresentou 100% de eficiência para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas (Umezawa et al, 1996b).

Assim, o reconhecimento da banda de 150-160 kDa pela totalidade dos soros de pacientes crônicos testados, e das bandas de 130-200 kDa correspondente ao SAPA, por soros de pacientes com infecção aguda direcionaram-nos na seleção destes antígenos por anticorpos anti-TESA e sonda.

O isolamento dos antígenos SAPA e de 160 kDa, imunodominantes de fases da infecção chagásica, abre perspectivas de sua utilização, tanto individualmente para detectar fases da doença e monitorar cura de pacientes chagásicos submetidos ao tratamento específico, assim como em mistura, ser

utilizado no diagnóstico confirmatório, como teste alternativo na sorologia da doença de Chagas.

Além disso, a busca de candidatos a marcadores de cura dentre os exo-antígenos é especulativa, mas pode se basear em alguns dados fundamentais mais consistentes, que evidencia a discriminação de pacientes tratados curados dos não curados.

Primeiramente, é provável que uma diminuição de resposta imune consequente à cura, possa ser mais precocemente observada em exoantígenos, já que estes estão disponíveis no sistema imunológico, quando os parasitas estão vivos. Se as moléculas que induzem os anticorpos líticos, presentes somente em infecções ativas, são detectadas com formas tripomastigotas vivas do *T.cruzi* e estão ausentes após tratamento eficaz (Krettli & Brener, 1982a; Krettli et al, 1984), elas poderiam provavelmente ser possíveis candidatas aos antígenos discriminatórios de cura. Se estes antígenos estão presentes apenas na superfície de parasitas vivos, há uma maior probabilidade de que sejam transitoriamente expressos na membrana, o que é compatível com antígenos ativamente liberados da superfície dos parasitas.

Martins et al. (1985), Norris et al. (1989) e Norris et al. (1994b) descrevem antígenos de 160 kDa como alvos dos anticorpos líticos e capazes de inibir a formação da C3 convertase, responsável pelo desencadeamento da lise mediada pelo complemento. Antígenos estes, que não foram reconhecidos por anticorpos de animais imunizados com formas lisadas do *T.cruzi*, mas somente naqueles com infecção chagásica ativa (Martins et al, 1985). Por outro lado, um clone de cDNA contendo parte do gene T-DAF (Tambourgi et al, 1993) tem a seqüência VTVxNVxLYNR característica da família das Trans-sialidases também secretadas (Schenkman et al, 1994) e apresenta capacidade inibitória similar ao do antígeno de 160 kDa (Krautz et al., 2000).

Sobrenadante de cultivo de células infectadas com *T. cruzi* utilizadas em ELISA, para o diagnóstico de cura de pacientes crônicos, mostrou-se promissor (Gazzinelli et al., 1993; Krautz et al., 1994). Porém, esta fração contém moléculas com epítomos  $\alpha$ -galactosil, também reconhecidas por soros chagásicos, que podem interferir neste diagnóstico (Almeida et al., 1993; Umezawa et al., 2001a). Além disso, a quantidade de antígenos presentes

nesta fração, torna difícil sua padronização, devido o alto conteúdo de proteínas exógenas.

Finalmente, é condição essencial para a escolha de um marcador de cura, o seu próprio reconhecimento por todos os pacientes chagásicos, para possibilitar um acompanhamento eficaz da queda pós-tratamento. Os resultados fornecidos pelo TESA-blot (Umezawa et al, 1996b), demonstram que o antígeno de 150-160 kDa, presente na fração TESA apresenta este requisito.

## 2. Objetivos

### Objetivo Geral:

Isolamento e identificação de genes que expressam peptídeos imunodominantes dos antígenos excretados-secretados pelas formas tripomastigotas (TESA) do *T. cruzi*, para finalidades imunodiagnósticas.

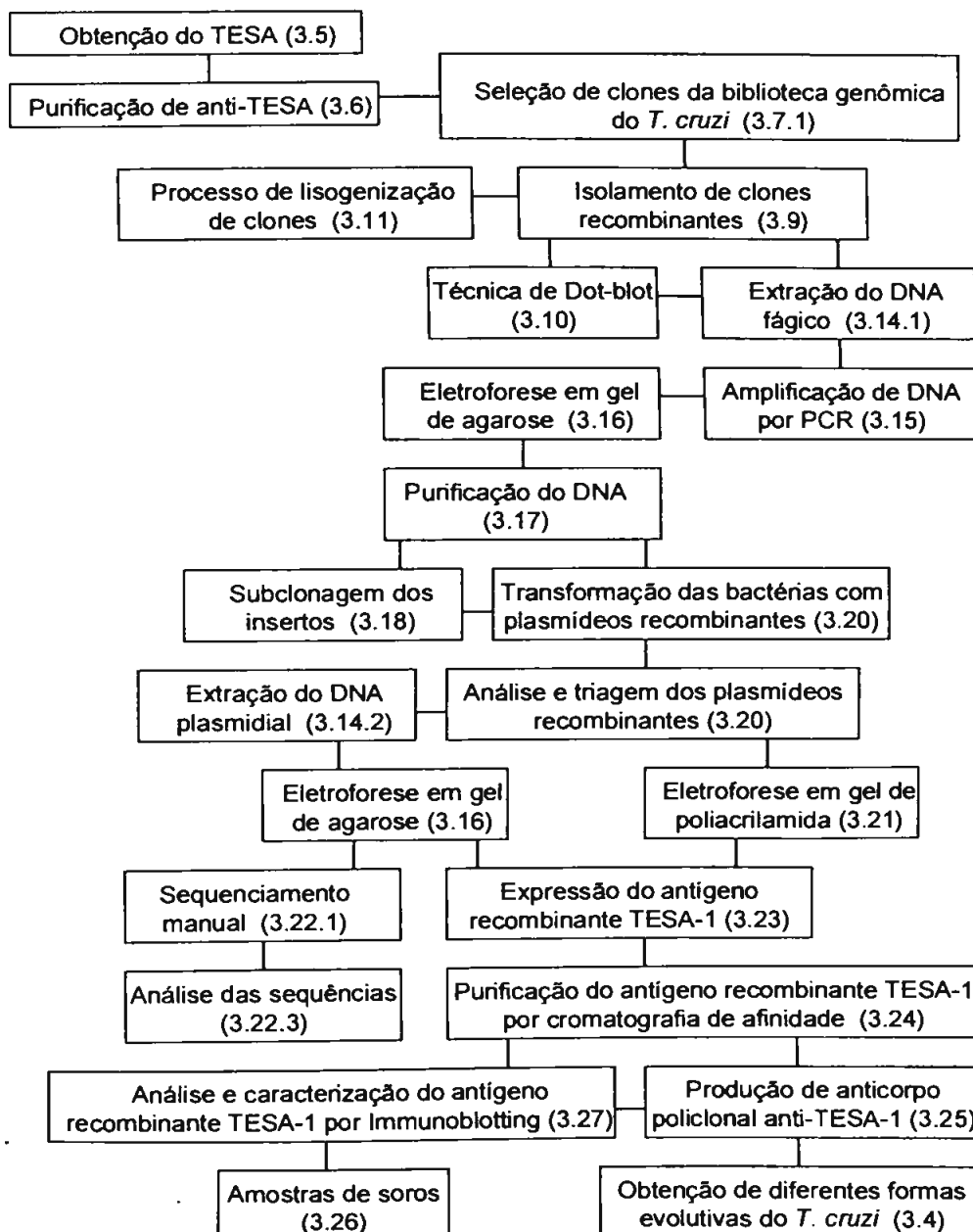
### Objetivos Específicos:

- ⇒ Isolamento de clones contendo fragmentos gênicos que codificam antígenos excretados-secretados pelas formas tripomastigotas (TESA), utilizando bibliotecas construídas em vetores  $\lambda$ gt11 (DNA) e  $\lambda$ ZAP (cDNA) do *T. cruzi*.
- ⇒ Sequenciamento dos fragmentos de DNA selecionados.
- ⇒ Produção de proteínas recombinantes em *E. coli*.
- ⇒ Identificação da expressão dos peptídeos recombinantes nas formas tripomastigota, epimastigota e amastigota e na fração TESA de diferentes cepas do *T. cruzi*.
- ⇒ Análise do potencial dos peptídeos obtidos no imunodiagnóstico da doença de Chagas.

### 3. Materiais e Métodos

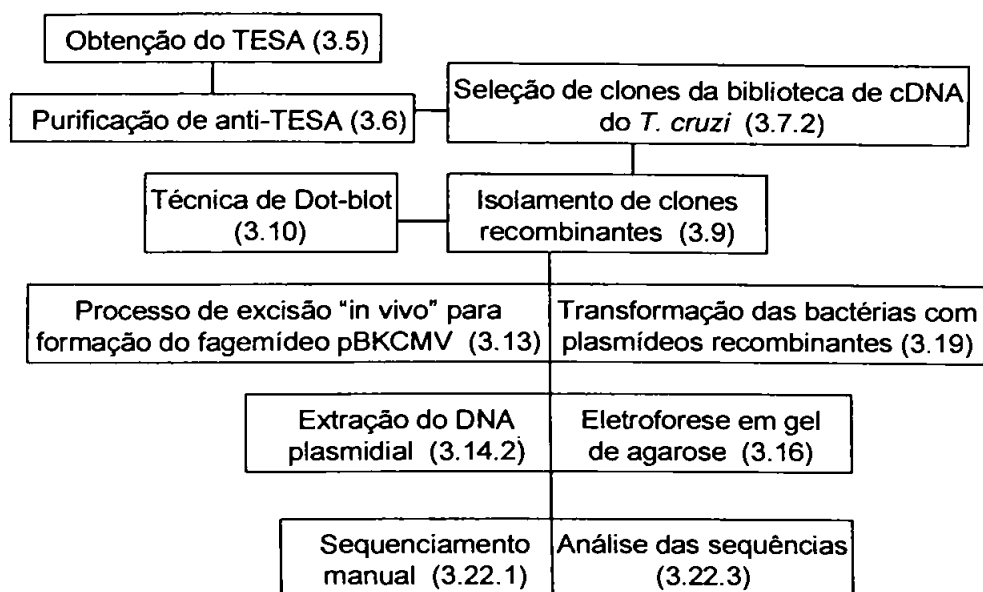
Os fluxogramas 1-3 sumarizam os tópicos de materiais e métodos.

As características dos vetores moleculares empregados neste trabalho se encontram nos anexos.

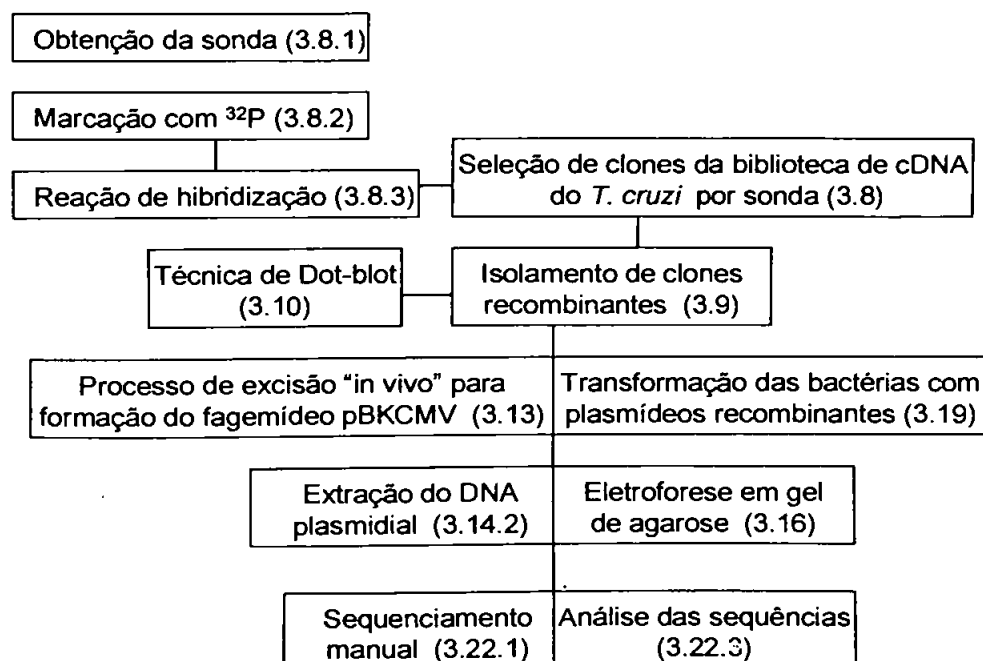


**Fluxograma 1** – Seleção, subclonagem, expressão e análise de clone recombinante obtido a partir de uma biblioteca de DNA, construída em  $\lambda$ gt11.





**Fluxograma 2** - Seleção de clones da biblioteca de cDNA do *T. cruzi*, construída em  $\lambda$ ZAP, com anticorpos anti-TESA.



**Fluxograma 3** - Seleção de clones da biblioteca de cDNA do *T. cruzi*, construída em  $\lambda$ ZAP, com a sonda do TESA-1

### 3.1 Meios de cultura, soluções e antibióticos

Os meios de cultura e soluções foram preparados em H<sub>2</sub>O purificada pelo sistema Milli Q (Millipore Co) e em seguida, autoclavados a 120°C por 20 minutos. As soluções que sofrem alterações em elevadas temperaturas, como antibióticos, foram esterilizadas por filtração em membrana com 0,22 µm de porosidade (Millipore Co).

Todos os reagentes utilizados nestas preparações foram de grau analítico e com procedência da Amersham Biosciences, Difco Laboratories, Gibco-BRL, Merck Company, Millipore Corporation, Promega Corporation e Sigma Chemical Company.

#### 3.1.1 Meios de cultura:

LB (Luria-Bertani): Triptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; H<sub>2</sub>O q.s.p. 1 L. Ajustado pH para 7,3, autoclavado e conservado a temperatura ambiente.

LB-ágar: Triptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; Ágar 15 g/L; H<sub>2</sub>O q.s.p. 1 L. Ajustado pH para 7,3, autoclavado, resfriado a 50°C e distribuído em volumes de 20 ml por placa, com ou sem adição de antibiótico. Estocado a 4°C.

2 x YT: Triptona 16 g/L; Extrato de levedura 10 g/L; NaCl 10 g/L; H<sub>2</sub>O q.s.p. 1L. Ajustado pH para 7,3 e autoclavado.

Gelose Mole ou "Top agar": LB ou 2 x YT acrescidos de ágar 8 g/L. Autoclavado, distribuído em alíquotas de 3 ml por tubo e conservado a 4°C.

LIT (Liver Infusion Tryptose): Infusão de fígado 5 g/L; Triptose 5 g/L; NaCl 4 g/L; KCl 0,4 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 g/L; Glicose 2 g/L; Hemina 10 mg/L e Soro Fetal Bovino (SFB) 100 ml/L. Ajustado pH para 7,2, esterilizado por filtração e conservado a 4°C.

#### 3.1.2 Soluções:

Solução de IPTG (Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) 1M: IPTG 238,3 mg/ml; H<sub>2</sub>O q.s.p. 1 ml. Conservado ao abrigo da luz a -20°C.

Solução de 5-bromo 4-cloro 3-indolil 2-D-galactopiranosídeo (X-gal): 20 mg; Dimetil formamida 1 ml. Conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Solução Diluente de  $\lambda$  :  $\text{MgSO}_4$  1,2 g/L; Tris-HCl 1 M (pH 7,5) 10 ml;  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1 L.

Solução Denhardt's (50 X): Ficoll 5 g; Polivinil-pirrolidona 5 g; Soro albumina bovina (Fração V) 5 g;  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 500 ml. Filtrado e conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Solução de Maltose 20%: Maltose 20 g;  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 100 ml. Esterilizado por filtração e conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Tampão PBS (Tampão salina fosfato):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM; NaCl 150 mM;  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1 L. Ajustado pH para 7,2.

Solução de desnaturação: NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M;  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1 L.

Solução de neutralização: NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,5 M;  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1 L. Ajustado pH para 8,0.

Solução de hibridização: SSC 5X; Denhardt's 10%; DNA de espermatozoides de salmão 1%; tRNA 0,5%; Formamida 50%. Conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Solução Salina Citrato (SSC): NaCl 0,15 M; Citrato de sódio 0,015 M;  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1 L. Ajustado pH para 7,5.

Tampão Sódio e Magnésio (SM): NaCl 5,8 g/L;  $\text{MgSO}_4$  1,2 g/L; Gelatina 2% 5 ml; Tris-HCl 1 M (pH 7,5) 50 ml;  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1 L. Autoclavado e conservado ao abrigo da luz.

Tampão Tris-ácido acético-EDTA (TAE): Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM. Ajustado pH para 8,0.

Tampão Tris-borato-EDTA (TBE): Tris-borato 45 mM; EDTA 1 mM;  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1 L. Ajustado pH para 8,3.

Tampão Tris-EDTA (TE): Tris HCl 10 mM; EDTA 1 mM;  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1 L. Ajustado pH para 8,0.

Tampão TSB: Triptona 1 g; Extrato de levedura 0,5 g; NaCl 0,5 g; PEG (3350) 10 g;  $\text{MgSO}_4$  10 mM;  $\text{MgCl}_2$  10 mM; DMSO (Dimetil sulfóxido) 5 ml e  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 100 ml. Ajustado pH para 6,1; esterilizado por filtração e conservado a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.3 Antibióticos:

Ampicilina (Amp): 10 g, H<sub>2</sub>O q.s.p. 100 ml (Solução mãe). Esterilizado por filtração, distribuído em alíquotas e conservado a -20°C. Concentração utilizada: 100 µg/ml.

Tetraciclina (Tet): 2,5 g, H<sub>2</sub>O q.s.p. 100 ml (Solução mãe). Esterilizado por filtração, distribuído em alíquotas e conservado a -20°C. Concentração utilizada: 12,5 µg/ml.

Canamicina (Can): sulfato de canamicina 3 g, H<sub>2</sub>O q.s.p. 100 ml (Solução mãe). Esterilizado por filtração, distribuído em alíquotas e conservado a -20°C. Concentração utilizada: 30 µg/ml.

## 3.2 Bactérias e Bacteriófagos

### 3.2.1 Bactérias

As bactérias foram conservadas em meio LB líquido a -70°C com 7% de DMSO (dimetil sulfóxido) ou mantidas em meio LB sólido a 4°C, na presença de antibiótico, quando necessário.

As linhagens de *E. coli* utilizadas como hospedeiras do bacteriófago λgt11 foram Y1090 para o ciclo lítico e Y1089 para o ciclo lisogênico

**Y1090** – Genótipo: *E. coli* *kl12*,  $\Delta$ -*lacU169*, *proA*<sup>+</sup>,  $\Delta$ -*lon*, *araD139*, *strA*, *supF*, (*trpC22:tr10*), *hsdR*<sup>-</sup>, *hsdM*<sup>+</sup>, (pMC9).

Condições utilizadas: Uma colônia foi isolada a partir de uma placa de meio LB e transferida para 5 ml de meio LB líquido com 100 µg/ml de ampicilina e 0,2% de maltose. As bactérias foram cultivadas a 37°C em agitação constante durante 16 a 18 hs para uso imediato, em concentração equivalente a DO<sub>600</sub> = 1,0.

**Y1089** - Genótipo: *E. coli* *kl12*,  $\Delta$ -*lacU169*, *proA*<sup>+</sup>,  $\Delta$ -*lon*, *araD139*, *strA*, *sflA*, (*chr:tn10*), *hsdR*<sup>-</sup>, *hsdM*<sup>+</sup>, (pMC9).

Condições utilizadas: Uma colônia foi isolada de uma placa com meio LB e semeada em 5 ml de LB suplementado com 0,2% de maltose e 10 mM de MgSO<sub>4</sub>. As bactérias foram cultivadas durante 4 hs a 32°C sob agitação constante para utilização imediata.

Para o bacteriófago  $\lambda$  Zap Express utilizou-se, como célula hospedeira, a linhagem de *E. coli*:

**XL1-Blue MRF'** – Genótipo:  $\Delta(mcrA) 183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ \Delta M15 Tn10 (Tetr)]$ .

Condições utilizadas: Uma colônia foi isolada a partir de uma placa de cultura em meio LB com 12,5  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina e semeada em 5 ml de meio LB com 0,2% de maltose e 10 mM de  $\text{MgSO}_4$ . As bactérias foram cultivadas durante 5 hs a 37°C em agitação constante e o sedimento celular ressuspense em 10 mM de  $\text{MgSO}_4$  numa concentração equivalente a uma  $\text{DO}_{600} = 0,5$ .

Para a propagação dos plasmídeos pGEM-T, pGEX e pBKCMV foram utilizadas as linhagens de *E. coli*:

**DH5 $\alpha$**  - Genótipo:  $[F^-, \phi 80d lacZ\Delta M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, (r_k^-, m_k^+), supE44, relA1, deoR, \Delta(lacZA-argF)U169]$ .

Condições utilizadas: Uma colônia foi isolada a partir de uma placa com meio LB e cultivada em 5 ml de meio LB líquido durante 18 hs a 37°C sob agitação constante. A suspensão bacteriana foi diluída 1:100 e cultivada por mais 3 hs ou até o início da fase logarítmica ( $\text{DO}_{600}=0,6$ ). O sedimento recuperado por centrifugação foi ressuspense em TSB gelado, na diluição de 1/10 do volume original e usado imediatamente no processo de transformação com plasmídeos (item 3.19).

**XL0LR** – Genótipo:  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^Z\Delta M15 Tn10(Tet^r)]Su- \lambda^r$ .

Condições utilizadas: Uma colônia foi isolada a partir de uma placa com meio LB suplementada com 12,5  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina e cultivada em 5 ml de meio LB líquido durante 5 hs a 37°C sob agitação constante. O sedimento celular foi ressuspense em meio LB, sem adição de antibiótico, numa concentração equivalente a  $\text{DO}_{600} = 1,0$ .

### 3.2.2 Bacteriófagos

**$\lambda\text{gt}11$**  – Genótipo:  $\lambda lac5, \Delta shndIII \lambda 2-3 srI\lambda 3^0 srI\lambda 4^0 srI\lambda 5^0 cIts857 nin5$  Sam100.

O bacteriófago  $\lambda$ gt11, descrito por Young & Davis (1983), foi empregado como vetor na construção da biblioteca genômica do *T. cruzi* obtida por Cotrim et al. (1990).

Antes de ser utilizada para a seleção de clones descrita no item 3.7.1, a biblioteca foi expandida por amplificação em placas com meio LB. Para a amplificação, uma mistura de 100  $\mu$ l ( $\sim 10^5$  bacteriófagos) da biblioteca e de 200  $\mu$ l da suspensão de Y1090 ( $DO_{600}=1,0$ ) foi incubada a 37°C por 15 min. A mistura foi incorporada com 3 ml de gelose mole a 56°C e colocada imediatamente sobre a placa de meio LB. Após solidificação, a placa foi incubada por 16 hs a 37°C para a obtenção de lise confluenta. Após adição de 5 ml de Tampão SM, a placa foi submetida à agitação branda por 2 hs a temperatura ambiente. O SM foi recolhido e o sedimento recolhido por centrifugação a 7000 x g por 30 min a 4°C, para remoção de fragmentos celulares. O sobrenadante, rico em bacteriófagos, foi conservado a 4°C.

Após amplificação, os clones recombinantes da biblioteca foram analisados através do plaqueamento na presença de X-gal/IPTG. Para tanto, uma mistura de 100  $\mu$ l da diluição da biblioteca e 200  $\mu$ l da suspensão de Y1090 ( $DO_{600}=1,0$ ) foi incubada a 37°C por 15 min e plaqueada com 3 ml de gelose mole a 56°C contendo 40  $\mu$ l de X-gal (20 mg/ml) e 4  $\mu$ l de IPTG 1 M. A placa solidificada foi incubada por 18 hs a 37°C. Após indução, a presença de placas de lise de coloração azul é indicativa da expressão de  $\beta$ -galactosidase intacta (clones não recombinantes). Por outro lado, placas de lises brancas indicam expressão de  $\beta$ -galactosidase inativa (ou em fusão), produzida por um clone recombinante.

Após verificação da presença maciça de recombinantes, a biblioteca foi conservada a 4°C em alíquotas de 1 ml com adição de 5% de clorofórmio, pronta para uso.

A biblioteca de cDNA do *T. cruzi*, construída em vetor bacteriófago  $\lambda$ ZAP Express, foi gentilmente cedida pelo Dr. Jerry E. Manning do Departamento de Biologia e Bioquímica Molecular da Universidade da Califórnia. Antes do uso, foi testada e preservada de maneira análoga à construída com  $\lambda$ gt11.

$\lambda$  ZAP – Genótipo:  $\lambda$ sbhI $\lambda$ 1° *chiA*131 (T *amp* Co1E1 *ori lacZ'* T3 promoter-polycloining site-T7 promoter I) *srI* $\lambda$ 3° *cIts*857 *srI* $\lambda$ 5° Sam100

$\lambda$  ZAP Express™ é um produto patenteado pela Stratagene's United States sob o nº 5.128.256.

### 3.3 Enzimas de restrição e enzimas modificadoras de DNA

Foram utilizadas as enzimas de restrição: *EcoRI*, *XhoI* (Amersham Biosciences), *ApaI*, *PstI*, *RsaI*, (Gibco-BRL) para a clivagem dos sítios de clonagem localizados na região “polylinker” dos vetores.

Enzimas de Ligação: T<sub>4</sub> DNA ligase (Gibco-BRL) foi usada para ligação do inserto ao plasmídeo, nas subclonagens realizadas em vetores pGEM-T e pGEX.

### 3.4 Obtenção de diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*

As formas epimastigotas do *T. cruzi*, cepa Y (Silva & Nussenzweig, 1953), foram cultivadas em meio líquido de LIT (Liver Infusion Tryptose), por 7 dias a uma temperatura de 28°C (Yager & Miller, 1963).

As formas amastigotas do *T. cruzi*, cepa Y, foram obtidas do baço e fígado de camundongos infectados e purificadas em gradiente com metrizamida (Abrahamson et al., 1983).

As formas tripomastigotas do *T. cruzi* foram obtidas do sobrenadante de cultura em células LLC-MK<sub>2</sub> crescidas em meio RPMI, suplementada com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) e previamente infectadas com a cepa Y do *T. cruzi*. As formas tripomastigotas (10-15x10<sup>6</sup> parasitas/ml) foram recolhidas do sobrenadante após o 5º dia de infecção.

Os parasitas foram recuperados por centrifugação e lavados 3 vezes, por 10 min cada, em PBS. Após lavagens, o sedimento obtido foi imediatamente ressuspenso em tampão de lise (item 3.27) e submetido ao SDS-PAGE e depois ao “Immunoblotting”.

### **3.5 Obtenção do antígeno excretado e secretado de tripomastigota (TESA) do *T. cruzi***

Para verificar se outras cepas apresentam o epítopo que codifica a proteína de 160 kDa do *T. cruzi*, a fração TESA de 8 diferentes cepas do parasita foram utilizadas: Y, BS-IMT, DP2, DP3, JBR, CL, G, Tulahuen. A fração TESA da cepa Y foi utilizada para purificação por afinidade de anticorpos anti-TESA de soros de pacientes chagásicos (item 3.6).

O antígeno excretado e secretado de formas tripomastigotas (TESA) foi obtido do sobrenadante de células previamente infectadas com o parasita, segundo Jazin et al. (1991) e Umezawa et al. (1996b).

Inicialmente, as células LLC-MK<sub>2</sub> foram infectadas com  $5 \times 10^6$  parasitas/20 cm<sup>3</sup> em meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co) suplementado de 5% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 hs da infecção, a camada celular foi lavada 2 vezes em meio RPMI sem soro e reincubadas novamente em meio RPMI suplementado de 2% de SFB. Após reincubação, o sobrenadante de cultura contendo  $10\text{-}20 \times 10^6$  parasitas/ml, foi recolhido após centrifugação (2.800 x g, 10 min., 4°C). O sobrenadante, contendo a fração TESA, foi filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore) e utilizado imediatamente ou conservado a -70°C.

### **3.6 Purificação de anticorpos anti-TESA por afinidade ao TESA-blot**

Os anticorpos que reagem especificamente com proteínas excretadas e secretadas do *T. cruzi* por TESA-blot (Immunoblotting com TESA) foram purificados segundo técnica previamente descrita por Umezawa et al. (1993).

Inicialmente, a fração TESA da cepa Y do *T. cruzi*, foi separada em gel de SDS-PAGE (7%) e os antígenos foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (0,45 µm-Schleicher & Schuell), utilizando o sistema de eletroforese e transferência de proteínas (Bio-Rad Laboratories). A região compreendida por polipeptídeos de 110-180 kDa foi identificada e cortada do gel. Após transferência e bloqueio com 5% de leite desnatado diluído em PBS, a membrana foi incubada com soro de paciente chagásico de fase aguda ou crônica, por 18 hs a 4°C, sob agitação constante. Os soros foram diluídos a



1:20 em PBS-1% de leite desnatado. Após 5 lavagens consecutivas de 10 min em PBS, os anticorpos especificamente ligados ao TESA foram eluídos em tampão ácido (glicina 0,2 M; NaCl 0,15 M, pH 2,6) durante 5 minutos de contato em banho de gelo. Imediatamente após este tempo, os anticorpos coletados foram neutralizados com Tris-HCl 1 M pH 8,0 e conservados a -20°C com adição de 0,1% de soro albumina bovina. Estes anticorpos foram utilizados para a seleção de clones recombinantes do *T. cruzi*.

### **3.7 Seleção de clones recombinantes com anticorpos anti-TESA**

#### **3.7.1 Seleção de uma biblioteca genômica do *T. cruzi***

Uma biblioteca genômica de formas tripomastigotas metacíclicas da cepa G do *T. cruzi*, construída em vetor bacteriófago de expressão  $\lambda$ gt11 foi selecionada com anticorpos anti-TESA humano purificado por afinidade (item 3.6).

Para a seleção de clones foi usada a metodologia idealizada por Osaki et al. (1986).

Inicialmente, a biblioteca foi titulada, plaqueando-se as diluições em série com a suspensão de *E. coli* Y1090, utilizada conforme concentração descrita no item 3.2.1. Após titulação, a biblioteca foi plaqueada em 31 placas com meio LB, em título determinado para fornecer aproximadamente  $1 \times 10^3$  ufp (unidades formadoras de placas) por placa de petri.

Para o plaqueamento, 200  $\mu$ l de suspensão da *E. coli* Y1090 foram adicionadas em 100  $\mu$ l da biblioteca diluída em SM e a mistura foi incubada a 37°C durante 15 min, para permitir a adsorção dos fagos com a bactéria.

Em seguida, esta mistura foi incorporada com 3 ml de gelose mole a 56°C e imediatamente colocada na superfície de cada placa com meio LB. Após solidificação, as placas foram incubadas a 42°C, por um período de aproximadamente 2 hs ou até a formação de lises iniciais.

Após este período, as membranas de nitrocelulose (Millipore Co) umedecidas com solução de IPTG 10 mM (Amersham Biosciences) foram colocadas sobre o tapete bacteriano formado na superfície do ágar. Em

seguida, as placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 3 hs, para induzir a expressão de proteínas.

Após indução, as membranas contendo réplicas dos recombinantes foram retiradas e identificadas. As placas de LB com as lises originais foram mantidas a 4°C para o isolamento dos clones.

O vetor selvagem  $\lambda$ gt11 que expressa a  $\beta$ -galactosidase também foi processado nas mesmas condições e usado como controle de reação.

Todas as réplicas, inclusive do controle, foram lavadas 3 vezes em PBS e, em seguida bloqueadas em PBS-5% de leite desnatado por 1 h sob agitação moderada e constante.

As membranas bloqueadas foram incubadas com anti-TESEA humano por 16 hs a 4°C. Após 3 lavagens consecutivas de 10 min em PBS, as membranas foram incubadas com conjugado anti-IgG humano-HRP (horseradish peroxidase - Sigma Chemical Co) diluído em PBS com 1% de leite desnatado, por um período de 1 h e 30 min a 4°C.

Após incubação, as membranas foram novamente lavadas por 3 vezes em PBS e reveladas com solução cromógena (0,06 % de 4-cloro 1-naftol e 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação foi interrompida em H<sub>2</sub>O e as membranas foram secas entre folhas de papel de filtro para interpretação dos resultados. A reação foi considerada positiva quando apresentava coloração azul-púrpura. A especificidade da reação foi confirmada pela ausência desta coloração com o vetor  $\lambda$ gt11.

### **3.7.2 Seleção de uma biblioteca de cDNA do *T. cruzi***

Esta seleção foi realizada de uma biblioteca construída em vetor bacteriófago  $\lambda$ ZAP Express<sup>TM</sup>, com cDNA de tripomastigotas da cepa Esmeraldo do *T. cruzi*, provenientes de cultivo em células.

O procedimento técnico foi semelhante ao anteriormente descrito em 3.7.1, utilizando uma biblioteca genômica do *T. cruzi* para a seleção de clones.

Inicialmente, foram obtidas placas de lise, plaqueando-se a biblioteca de cDNA com a *E. coli* XL1-blue MRF', bactéria hospedeira utilizada na replicação do bacteriófago  $\lambda$ ZAP.

O plaqueamento da biblioteca foi feito em um total de 30 placas de meio LB, utilizando um título determinado para o fornecimento de  $2 \times 10^3$  ufp/placa de petri.

Após a formação de placas de lise, foram obtidas réplicas em membranas de nitrocelulose induzidas com IPTG.

O vetor selvagem  $\lambda$ ZAP foi processado nas mesmas condições e usado como controle de reação.

Similarmente ao procedimento descrito no item 3.7.1, as membranas foram bloqueadas, incubadas com anticorpo anti-TESEA humano e após lavagens, submetidas à incubação com conjugado anti-IgG humano-HRP (Sigma Chemical Co).

Após novas lavagens em PBS, as membranas foram reveladas com solução cromógena e conservadas ao abrigo da luz para interpretação dos resultados, utilizando-se dos critérios anteriormente descritos.

### **3.8 Seleção de clones recombinantes de uma biblioteca de cDNA do *T. cruzi* por sonda**

A biblioteca de cDNA de tripomastigotas do *T. cruzi*, construída em  $\lambda$ ZAP Express também foi utilizada para obtenção de clones recombinantes, selecionados através da hibridização com sonda marcada radioativamente com  $^{32}\text{P}$ .

Inicialmente, as placas de lise foram obtidas de maneira análoga à descrição do item 3.7.1, plaqueando-se a biblioteca com suspensão da *E. coli* XL1-blue MRF' (3.2.1) em 31 placas de meio LB, em título determinado para fornecer  $1 \times 10^3$  ufp/placa de petri.

Para a confecção das réplicas, as membranas foram identificadas e colocadas durante dois minutos em contato com o tapete bacteriano formado na superfície da placa. As réplicas em nitrocelulose foram submetidas ao tratamento prévio para reação de hibridização descrita no item 3.8.3. As placas de LB que originaram as réplicas foram conservadas a 4°C até o isolamento dos clones.

### 3.8.1. Obtenção da sonda

Foi utilizado como sonda, o fragmento de 203 pbs do inserto do clone TESA-1 do *T. cruzi*, que foi selecionado de uma biblioteca de DNA do *T. cruzi*, construída em  $\lambda$ gt11, com anticorpos anti-TESA (item 3.7.1).

Para a preparação da sonda, o DNA do clone TESA-1 foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*. O DNA digerido foi separado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e o fragmento correspondente ao inserto foi cortado do gel, purificado com GeneClean II (BIO 101, Inc) e marcado com  $^{32}\text{P}$ . O inserto foi purificado de acordo com as especificações de uso do fabricante (3.17).

### 3.8.2 Marcação com $^{32}\text{P}$

O inserto purificado do clone TESA-1 foi marcado com  $\alpha$ [ $^{32}\text{P}$ ]dCTP (Amersham Biosciences) segundo a técnica de "Random Primer", descrita por Feinberg & Vogelstein (1983), utilizando o kit RadPrimer (Gibco-BRL).

Um total de aproximadamente 20 ng/20  $\mu\text{l}$ , de DNA do inserto, foi tratado por aquecimento a 100°C durante 5 min, para separação da dupla fita de nucleotídeos. Após desnaturação, adicionou-se 1  $\mu\text{l}$  de solução 500  $\mu\text{M}$  de cada um dos nucleotídeos desoxi-adenosina trifosfato (dATP), desoxi-guanosina trifosfato (dGTP) e desoxi-timidina trifosfato (dTTP) e uma mistura de Tris-acetato 125 mM, pH 6,8; acetato de magnésio 12,5 mM; 2-mercaptoetanol 25 mM e de 1  $\mu\text{g}$  de "primer" randômico. Após o acréscimo de 60 U de DNA polimerase I (fragmento Klenow) e de 5  $\mu\text{l}$  (aproximadamente 50  $\mu\text{Ci}$ ) do  $[\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP, a mistura foi incubada a 25°C por 1 h e a reação foi bloqueada com EDTA 0,2 M; pH 7,5. O DNA marcado foi precipitado dos nucleotídeos livres com a adição de 8  $\mu\text{l}$  de DNA de esperma de salmão, 7  $\mu\text{l}$  de acetato de sódio 3M pH 4,5 e 125  $\mu\text{l}$  de etanol gelado por 18 h a -20°C. O sedimento foi recuperado por centrifugação a 10.000 x g/20 min/4°C e após secagem, foi ressuspenso em H<sub>2</sub>O e conservado a -20°C. A radioatividade do produto marcado foi determinada em líquido de cintilação, utilizando  $\beta$  counter (Amersham Biosciences).

### 3.8.3 Reação de hibridização de ácidos nucleicos

Para a hibridização, as réplicas em membranas de nitrocelulose obtidas conforme item 3.8, foram submetidas ao tratamento sobre papel de filtro umedecido com:

- a) solução de desnaturação (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) por 2 min;
- b) solução de neutralização (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,5 M pH 8,0) por 5 min;
- c) solução salina citrato (SSC 2X) com (NaCl 0,3 M, citrato de sódio 0,03M, EDTA 20 mM pH 8,0) por 2 min.

Após tratamento, as membranas de nitrocelulose foram colocadas em câmara de luz ultravioleta GS Gene Linker (BioRad Laboratories) e submetidas a 150 mJ, para fixação do DNA por "cross-linking". Após fixação, as membranas foram bloqueadas 2 vezes a 42°C, durante 2 hs em solução de hibridização com (SSC 5X, Denhardt's 10%, DNA de esperma de salmão 1%, tRNA 0,5%, formamida 50%). Para a reação de hibridização, a sonda radioativamente marcada com  $^{32}\text{P}$  foi adicionada nesta mesma solução, na concentração de  $1,6 \times 10^9$  cpm/20ng de DNA. Após incubação a 42°C por 18 hs, as membranas foram lavadas duas vezes a 42°C por 20 min com SSC 2X, SDS 0,1% e pirofosfato de sódio 0,1%; seguida de duas lavagens consecutivas a 56°C por 20 min com SSC 0,1X, SDS 0,1% e pirofosfato de sódio 0,1%. Para a autoradiografia, as membranas foram colocadas sobre filtro de papel e depois envoltas em filmes plásticos para exposição em filmes raios X (Kodak) durante 72 hs a -70°C. Após revelação, a autoradiografia foi usada para orientar a identificação dos clones positivos.

### 3.9 Isolamento de clones recombinantes

Todos os clones selecionados das bibliotecas de DNA e cDNA, através de anticorpos ou sonda, foram isolados a partir da placa de lise, coincidindo-se os sinais positivos detectados com as lises que originaram as réplicas.

Neste procedimento, as réplicas em nitrocelulose reveladas com solução cromógena ou por autoradiografia, tiveram seus sinais positivos copiados para uma folha de acetato de celulose. Após ser identificada pela

numeração, a cópia foi colocada sob a placa de LB correspondente que deu origem a réplica. Os clones considerados positivos foram localizados na lise de origem da réplica, por sobreposição dos três pontos de identificação feitos nas extremidades da membrana e placa de LB correspondente. Cada clone positivo foi coletado por aspiração e colocado em tubo Eppendorf com 500  $\mu$ l de SM e 50  $\mu$ l de clorofórmio. Em seguida, foram homogeneizados em vórtex e conservados a 4°C.

Para confirmar a positividade e assegurar a pureza de cada clone isolado, ciclos de isolamento foram repetidos, seguindo os procedimentos descritos nos itens 3.7.1., 3.7.2. e 3.8; até que 100% das lises fossem reconhecidas por anti-TESSA ou por sonda, nas réplicas de nitrocelulose originadas de cada placa.

### 3.10 Técnica de Dot-blot

A técnica de Dot-blot foi utilizada para confirmar e analisar a reatividade dos clones isolados das bibliotecas de DNA em  $\lambda$ gt11 e de cDNA em  $\lambda$ ZAP Express do *T. cruzi*.

As bactérias hospedeiras, *E. coli* Y1090 e XL1-blue MRF', foram cultivadas e empregadas, respectivamente para os vetores bacteriófagos  $\lambda$ gt11 e  $\lambda$ ZAP Express, em concentrações descritas no item 3.2.1.

Para o Dot-blot, inicialmente, adicionou-se na superfície de uma placa de meio LB, 200  $\mu$ l de suspensão bacteriana incorporada com 3 ml de gelose mole a 56°C. Após solidificação, a placa foi invertida e demarcada externamente em áreas com 1 cm<sup>2</sup> de superfície, seqüencialmente numeradas para aplicação dos clones. Em cada área demarcada, aplicou-se na superfície do ágar 1  $\mu$ l de cada clone (aproximadamente 70 a 100 ufp), além da aplicação de 1  $\mu$ l do vetor, incluído como controle da reação. Após difusão dos clones por 15 min, a placa foi invertida e incubada a 42°C, por aproximadamente 1 h ou até a formação de lise inicial. Em seguida, colocou-se na superfície do ágar uma membrana de nitrocelulose (Millipore Co) umedecida com solução de IPTG 10 mM (Amersham Biosciences) e a placa foi incubada a 37°C por 2 hs.

Após indução, a membrana foi retirada e a placa foi mantida a 4°C para a identificação e confirmação da reatividade dos clones.

Para a obtenção de mais réplicas, outra membrana era colocada na superfície da placa, e esta era novamente incubada a 37°C por um período adicional de 2 hs.

A réplica obtida foi processada conforme o item 3.7.1. A membrana foi lavada, bloqueada e incubada com anticorpos anti-TESEA purificados de soros chagásicos (3.6). Em seguida, foi lavada em PBS e incubada com conjugado anti-IgG humano-HRP (Sigma Chemical Co). Após novas lavagens em PBS, a membrana foi revelada em solução cromógena e a reação foi bloqueada com H<sub>2</sub>O. Para interpretação dos resultados, a reação foi considerada positiva quando apresentava coloração azul-púrpura no ponto de aplicação do clone.

### **3.11 Lisogenização de bactérias com clones recombinantes do $\lambda$ gt11**

Este processo descrito por Huynh et al, 1984, consiste na multiplicação de fagos, através da lisogenização do clone recombinante em *E. coli* Y1089 (item 3.2.1.), bactéria hospedeira do  $\lambda$ gt11, em função da presença do repressor lac, um produto do gene lac I.

Para a lisogenização, 50  $\mu$ l da suspensão da Y1089 (item 3.2.1) foram infectadas com diferentes concentrações de clones recombinantes  $\lambda$ gt11 e a mistura foi submetida à incubação de 32°C por 16 hs. Após infecção, a suspensão foi plaqueada em meio LB e incubada a 32°C por 18 hs. Cada colônia obtida foi semeada em duas placas de meio LB, e cada placa submetida a temperaturas distintas de incubação: uma a 32°C e outra a 42°C por aproximadamente 18 h. As colônias que cresciam somente a 32°C foram consideradas lisogênicas.

### **3.12 Absorção de soros com extratos bacterianos**

Os anticorpos séricos foram absorvidos com suspensões da *E. coli* e dos bacteriófagos  $\lambda$ gt11 ou  $\lambda$ ZAP, para eliminar a possibilidade de reações inespecíficas ocasionadas pelo reconhecimento de determinantes antigênicos

em comum presentes nos clones recombinantes, quando submetidos ao Dot-blot e “Immunoblotting”, sem qualquer purificação prévia.

Para a absorção de soros, uma colônia lisogênica de  $\lambda$ gt11 foi semeada em meio LB e cultivada a 32°C por 18 hs sob agitação constante. Após 3 lavagens consecutivas de 10 min em PBS, o sedimento celular foi recuperado por centrifugação e ressuspenso V/V a 1:20 em PBS. A suspensão foi distribuída em alíquotas e conservada a -20°C.

Antes do uso, as suspensões foram descongeladas e utilizadas para diluição dos soros. Os soros diluídos foram simultaneamente incubados com as suspensões e com os clones recombinantes submetidos à avaliação pelas técnicas de Dot-Blot e “Immunoblotting”.

### **3.13 Processo de excisão *in vivo* para formação do fagemídeo pBKCMV.**

Todos os clones fágicos isolados da biblioteca de cDNA, construída em  $\lambda$ ZAP Express, foram submetidos ao processo de excisão *in vivo*. Este processo permite a síntese e duplicação do vetor pBKCMV com o inserto, dando origem aos fagemídeos clonados.

O processo de excisão *in vivo* inicia simultaneamente com a presença de  $\lambda$ ZAP e do ExAssist (fago “helper”) dentro da *E. coli* XL1-blue MRF'. No interior bacteriano, proteínas do fago “helper” reconhecem a origem de replicação (ORI) localizada no próprio  $\lambda$ ZAP. Ao reconhecer este sítio de iniciação da replicação localizada no bacteriófago, a dupla fita do DNA se abre, iniciando a síntese de uma nova molécula. Durante a síntese, ocorre duplicação do DNA da região intergênica (iniciador/terminador) que carrega uma inserção de seqüências do pBKCMV e do inserto clonado. O DNA se circulariza derivando fagemídeos e a molécula é secretada do  $\lambda$ ZAP. O aquecimento a 70°C deste material, propicia a morte bacteriana e a lise do  $\lambda$ ZAP, mas não afeta a molécula de DNA que permanece íntegra e pode ser propagada em *E. coli* XL0LR.

Neste processo, a *E. coli* XL1-blue MRF' foi utilizada para replicação do  $\lambda$ ZAP Express e a *E. coli* XL0LR para propagação do pBKCMV em concentrações descritas no item 3.2.1.



O fago “helper” ExAssist™ (Stratagene) foi utilizado na concentração de  $1 \times 10^{10}$  ufp/ml, como fonte de proteínas derivadas do M13, indispensáveis na síntese e duplicação da molécula de DNA.

Para este procedimento, em um tubo Falcon de 50 ml, uma mistura de 200  $\mu$ l da suspensão de *E. coli* XL1-blue MRF' ( $DO_{600}=1,0$ ); 250  $\mu$ l do clone (conc. $>1 \times 10^5$  ufp) e de 1  $\mu$ l do ExAssist (fago “helper”) foi incubada durante 15 min a 37°C. Após adição de 3 ml de meio LB, a mistura foi incubada durante 3 hs a 37°C sob agitação constante e, em seguida submetida ao aquecimento a 70°C por 20 min. O material foi centrifugado e o sobrenadante contendo “fagemídeos” foi decantado e transferido para um novo tubo e conservado a 4°C.

Após excisão, o DNA dos fagemídeos presente no sobrenadante foi transformado em *E. coli* XL0LR. Para a transformação, 200  $\mu$ l da suspensão da XL0LR ( $DO_{600}=1,0$ ) foi adicionada em 10  $\mu$ l do DNA e a mistura incubada por 15 min a 37°C. Após adição de 300  $\mu$ l de meio LB, a mistura foi novamente incubada a 37°C por 45 min. O material transformado foi plaqueado em meio LB/can, na concentração de 30  $\mu$ g/ml e a placa foi incubada durante 18 hs a 37°C. As colônias obtidas foram cultivadas em meio LB/can e o DNA foi extraído conforme descrito no item 3.14.2.

### **3.14. Obtenção do DNA**

#### **3.14.1 Extração do DNA fágico**

A extração do DNA fágico dos clones recombinantes selecionados da biblioteca de  $\lambda$ gt11, foi realizada pelo método da placa lisada (Sambrook et al., 1989), que substitui o uso de ágar pela agarose, em todas as preparações de meio LB.

Inicialmente, uma placa de lise recentemente obtida de cada clone, foi isolada e colocada em 1 ml de tampão SM contendo 50  $\mu$ l de clorofórmio. Em seguida, foi homogeneizada em vortex e incubada durante 4 hs a 4°C para dispersão das partículas fágicas. O material obtido foi usado para produção de lise total em 4 placas de LB/clone. Em cada placa de meio LB, foi adicionada uma mistura com 100  $\mu$ l das partículas fágicas ( $\sim 10^5$  ufp) e 200  $\mu$ l da

suspensão da *E. coli* Y1090 (item 3.2.1.) incorporada em 3 ml de gelose mole a 56°C. Após incubação a 37°C por 18 horas para obtenção de lise total, foram adicionados 3 ml de solução diluente  $\lambda$  por placa. Em seguida, todas as placas foram submetidas a uma agitação constante e moderada durante 2 h à temperatura ambiente. A suspensão foi recolhida das placas e o sedimento bacteriano foi removido por centrifugação a 5000 x g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo NALGENE de 50 ml e tratado com RNase I (1mg/ml) e DNase (1 mg/ml) por 15 min a 37°C. Após adição de V/V de solução diluente  $\lambda$  contendo (PEG 8000 20%, NaCl 2M), o material foi incubado por 1 h em banho de gelo e o sedimento recolhido por centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4°C. O tubo foi invertido sobre papel de filtro para drenagem do líquido e o sedimento foi ressuspense em 0,5 ml de tampão TE e 5  $\mu$ l de SDS a 10%. Após incubação por 5 min a 68°C, adicionou-se 10  $\mu$ l de NaCl 5M e o material resultante foi extraído uma vez com uma mistura de V/V de fenol-clorofórmio (1:1) e por último, com V/V de clorofórmio. Em seguida, o DNA foi precipitado com isopropanol gelado e lavado com etanol gelado a 70%. Após secagem a vácuo, o DNA foi ressuspense em tampão TE pH 8,0 contendo 20  $\mu$ g/ml de RNase A e conservado a -20°C.

### 3.14.2 Extração do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi feita pela técnica de lise alcalina segundo Sambrook et al. (1989). O sedimento celular correspondente a 5,0 ml de cultura de 16 hs em meio LB/amp ou LB/can foi ressuspense em 100  $\mu$ l de solução I (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; glicose 50 mM), ao qual foram adicionados 200  $\mu$ l de solução II (NaOH 0,2 N e SDS 1%) e incubado por 5 min em banho de gelo. Após a adição de 200  $\mu$ l de solução III (acetato de potássio 3 M, ácido acético 1,15%) e nova incubação por 5 min em banho de gelo, o material foi centrifugado a 12.000 x g/4°C/5 minutos. A fase aquosa foi extraída 3 X com a mistura fenol:clorofórmio (1:1) e 1 X com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com V/V de isopropanol e lavado em etanol gelado a 70%. Após secagem a vácuo, o DNA resultante foi ressuspense em 50  $\mu$ l de tampão TE pH 8,0 contendo 20  $\mu$ g/ml de RNase A e conservado a 4°C.

A quantificação do DNA foi determinada em  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  por espectrometria no GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (Amersham Biosciences). A leitura das amostras de DNA foi realizada em cubetas de sílica com capacidade de 100  $\mu\text{l}$ , utilizando comprímetero de onda UV, de 260 nm.

### 3.15 Amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de PCR (Reação em cadeia da polimerase) foi utilizada para amplificação de insertos do DNA dos clones recombinantes isolados da biblioteca com  $\lambda\text{gt}11$ . A amplificação foi realizada com 200 ng de DNA; 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador; 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM da mistura de dNTP (GIBCO-BRL) em um volume total de 100  $\mu\text{l}$  e com um "hot start" de 10 min a 98°C. Após 10 min a 90°C para adição de 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (GIBCO-BRL), um total de 30 ciclos de amplificação foram realizados nas seguintes condições: 1 min de desnaturação a 94°C; 2 min de anelamento a 55°C e 3 min de alongação a 72°C, seguidos por 7 min de extensão da cadeia a 72°C, utilizando o termociclador (MJ Research).

O DNA dos insertos de clones recombinantes do  $\lambda\text{gt}11$  foram amplificados por PCR com os oligonucleotídeos senso, 5'GGT GGC GAC GAC TCC TGG AGC CCG 3' e anti-senso, 5'TTG ACA CCA GAC CAA CTG GTA ATG 3' complementares ao  $\lambda\text{gt}11$  original (Promega Corp.).

### 3.16 Eletroforese em gel de agarose

O DNA dos clones isolados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose ultra pura (Sigma Chemical Co) para análise dos fragmentos e em gel de agarose com baixo ponto de fusão NuSieve (FMC Corp.) para separação dos fragmentos dos insertos a serem purificados. As concentrações utilizadas de géis de agarose variaram de 0,8-2,0%, em função do tamanho dos insertos obtidos e os tampões empregados foram TBE ou TAE (3.1.2) com adição de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de solução de brometo de etídio. As amostras foram preparadas em tampão com (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%; glicerol 30%) na proporção 1:6 e submetidas à separação eletroforética durante 60 min a 80V. O DNA do padrão de tamanho molecular *Hind* III (125 a 23.130 (pb) pares

de bases) e *Hae* III (72 a 1.353 pb) (Gibco-BRL) foram diluídos neste tampão e incluídos em cada corrida de gel. Os fragmentos foram visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta (UV) composto por um sistema de documentação com câmara fotográfica Polaroid (Bio-Rad Laboratories).

### 3.17 Purificação do DNA

Para a purificação, o DNA de cada clone recombinante foi tratado com enzima de restrição e separado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% ou a 2%. O fragmento do inserto foi cortado do gel e purificado com GeneClean II (BIO 101, Inc).

O inserto foi purificado segundo as especificações do fabricante e utilizado para subclonagem.

### 3.18 Subclonagem dos insertos

Para análise das seqüências de nucleotídeos, o inserto amplificado por PCR do clone TESA-1 foi purificado do gel de agarose e subclonado em plasmídeo pGEM-T (Promega Corp.).

Para expressão e produção do antígeno recombinante em grande escala, a fase de leitura aberta do fragmento de 203 pb de TESA-1, localizada dentro da região do sítio *Eco*RI (GAATTC), foi subclonada em plasmídeo pGEX-1 $\lambda$ T (Smith & Johnson, 1988) (Amersham Biosciences).

O plasmídeo pGEM-T, com extremidade 3'T especialmente projetada para subclonar produtos de PCR, foi ligado ao DNA do inserto sem necessidade de defosforilação.

O DNA do plasmídeo pGEX-1 $\lambda$ T foi clivado com *Eco*RI e defosforilado com Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) da (Gibco BRL), antes de ser ligado ao inserto. CIAP é uma fosfomonoesterase que remove o fosfato 3' ou 5' do DNA, impedindo a religação do plasmídeo.

Para defosforilação, 1  $\mu$ g de DNA do plasmídeo digerido foi adicionado com 2,6 U/ $\mu$ l de CIAP e a mistura foi incubada a 37°C por 30 min, seguida de outra a 56°C por mais 30 min. Após a adição de mais 2,6 U/ $\mu$ l de CIAP, a incubação alternada foi repetida e a mistura finalmente foi incubada a 68°C por

10 min para inativação enzimática. Após defosforilação, o DNA foi extraído 2 vezes com V/V de fenol:clorofórmio (1:1). Em seguida, adicionou-se na fase aquosa 2,5 V de etanol absoluto e 0,1 V de acetato de sódio 3M pH 4,8 e a mistura foi incubada por 30 min a  $-20^{\circ}\text{C}$  para precipitar o DNA. O DNA defosforilado foi recuperado por centrifugação a  $13.000 \times g/10 \text{ min}/4^{\circ}\text{C}$ , lavado em etanol a 70% gelado e após secagem a vácuo, foi ressuspensão em TE e conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para a ligação do inserto ao plasmídeo, foram adicionados em um tubo Eppendorf, 2  $\mu\text{l}$  do tampão 5X  $T_4$  DNA ligase, 25 ng do plasmídeo defosforilado, 100 ng do DNA do inserto, 1  $\mu\text{l}$  de  $T_4$  DNA ligase e 10 mM de adenosina trifosfato (ATP). Após incubação de 3 hs a  $15^{\circ}\text{C}$ , o produto ligado foi transformado em *E. coli* DH5 $\alpha$ .

### 3.19 Transformação das bactérias com plasmídeos recombinantes

A transformação da *E. coli* com plasmídeos recombinantes foi realizada segundo a técnica descrita por Chung & Miller (1988).

A suspensão de *E. coli* DH5 $\alpha$  foi obtida de cultura recentemente preparada, conforme condições detalhadas no item 3.2.1, e imediatamente, usadas no processo de transformação.

Para a transformação, em um tubo Eppendorf previamente gelado, foram colocados 10 ng do DNA e 100  $\mu\text{l}$  da *E. coli* DH5 $\alpha$  e a suspensão foi incubada por 30 min em banho de gelo. Em seguida, 900  $\mu\text{l}$  de TSB com 20 mM de glicose foram adicionados e a suspensão foi incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 hs sob agitação constante. Após centrifugação rápida para sedimentação das células, cerca de 800  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 200  $\mu\text{l}$  do volume remanescente.

O produto transformado em *E. coli* com pGEX foi plaqueado em meio LB/amp. Uma placa semelhante acrescida por X-gal e IPTG foi utilizada para plaquear o produto resultante da transformação com pGEM-T. As placas foram incubadas por 24 hs a  $37^{\circ}\text{C}$  e o DNA das colônias foi extraído conforme item 3.14.2.

### 3.20 Análise e triagem dos plasmídeos recombinantes

A análise de plasmídeos recombinantes obtidos por subclonagem do DNA em vetor de sequenciamento pGEM-T e em vetor de expressão pGEX foi realizada após processo de transformação em *E. coli*.

As colônias recombinantes que cresceram após transformação com o plasmídeo pGEM-T foram selecionadas pela coloração branca, excluindo-se as de coloração azul, não recombinantes, resultantes da expressão de  $\beta$ -galactosidase pelo gene lacZ deste vetor, na presença de X-gal.

Após extração, o DNA das colônias transformantes, foi digerido com as enzimas *Apal* e *PstI* e submetido à separação eletroforética em gel de agarose (0,8% ou 2%), para confirmar a presença de inserto.

Para a triagem de plasmídeos recombinantes subclonados no vetor de expressão pGEX-1 $\lambda$ T, as colônias transformantes foram semeadas em meio LB/amp e cultivadas a 37°C durante 18 hs em agitação constante. As suspensões obtidas foram inoculadas em novo meio de cultura e durante a fase exponencial de crescimento, adicionou-se IPTG na concentração de 0,5 mM para indução da expressão por 3 hs sob agitação constante. O sedimento celular recuperado por centrifugação foi ressuspense em tampão de amostra e submetido à separação eletroforética em SDS/PAGE a 10% (3.21). A presença da proteína em fusão com GST foi confirmada, comparando-se o PM obtido com o da proteína GST expressa pelo vetor pGEX, usado como controle de expressão.

### 3.21 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Esta técnica, descrita por Laemmli (1970), foi utilizada para triagem das colônias transformantes com plasmídeos pGEX ligado ao inserto de TESA-1.

Nesta triagem, foi utilizado SDS-PAGE com gel de separação a 10% em tampão Tris-HCl 375 mM pH 8,8 com 0,1% de SDS e com gel de empilhamento a 4,5% em tampão Tris-HCl 125 mM com SDS 0,1%. O sedimento celular das colônias transformantes cultivadas, conforme item 3.20, foi ressuspense em tampão de amostra (Tris-HCl 60 mM, pH 6,8; glicerol 25%; SDS 2%; 2-mercaptoetanol 14,4 mM e azul de bromofenol 0,1%) e tratado por

aquecimento a 100°C durante 5 min. Os padrões de baixo peso molecular: fosforilase b do músculo de rato - 94,0 kDa; albumina bovina - 67,0 kDa; albumina do ovo - 43,0 kDa; anidrase carbônica bovina - 30,0 kDa; inibidor de tripsina da soja - 20,1 kDa e  $\alpha$ -lactoalbumina bovina - 14,4 kDa (Amersham Biosciences) foram preparados conforme recomendações do fornecedor e incluídos em cada gel. A separação eletroforética foi realizada a 100 V em tampão Tris-HCl 20 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%. O gel foi corado com Azul de Coomassie 1% em metanol 45% e ácido acético 45% e a descoloração foi realizada com 3 trocas de ácido acético a 7%.

### **3.22 Sequenciamento de clones recombinantes**

#### **3.22.1 Sequenciamento manual**

O sequenciamento manual foi realizado pelo método de “dideoxynucleotide chain termination” descrito por Sanger et al. (1977) e utilizado para determinar a seqüência de nucleotídeos do DNA dos clones obtidos da biblioteca genômica de *T. cruzi* com  $\lambda$ gt11. Posteriormente, a seqüência de nucleotídeos do clone TESA-1 obtida manualmente foi confirmada por sequenciamento semi-automático realizado segundo o item 3.22.2.

A reação de sequenciamento foi feita com “Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator kit” (Amersham Biosciences) que contém nucleotídeos marcados com [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]ddNTP. Um total de 16 ciclos: 30 segundos a 90°C, 30 segundos a 60°C e 1 min a 72°C, de acordo com a especificação de uso do produto, foi amplificado utilizando o termociclador (MJ Research).

O gel de sequenciamento foi confeccionado em placas de vidro, montadas entre espaçadores com 0,4 mm de espessura. A concentração do gel utilizada foi de 6% (acrilamida 5,7%, bis-acrilamida 0,3%, uréia 42%, TBE (10X) 10 ml, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,01%) e a corrida foi feita em tampão TBE 0,6% durante 4 horas a 75 watts, na temperatura de aproximadamente 52°C.

Após eletroforese e secagem, o gel foi exposto em filme raios X (Kodak) durante 24-36 hs e revelado por autoradiografia.

### 3.22.2 Sequenciamento semi-automático

A sequência de nucleotídeos do DNA dos clones recombinantes selecionados por sonda de TESA-1 da biblioteca em  $\lambda$ ZAP Express com cDNA de *T. cruzi* foi determinada no seqüenciador semi-automático, “ABI Prisma 377 DNA Sequencer” (Perkins Elmer). A reação de sequenciamento foi realizada com “BigDye Terminator Ready Reaction kit” utilizando 2  $\mu$ l do reagente, 1,6 pM dos “primers” (T3 e T7) e 500 ng de DNA amplificados no termociclador GeneAmp PCR System 9600, segundo condições recomendadas pelo fabricante: 1 ciclo de 5 min a 96°C, 25 ciclos de: 20 seg a 96°C, 10 seg a 50°C e 4 min a 60°C. O DNA foi precipitado 1 vez em etanol a 80% e 2 vezes a 70% e, após secagem foi ressuspenso em 2,5  $\mu$ l de “loading buffer”. As amostras foram tratadas a 90°C por 2 min e em seguida, submetidas à corrida em gel de poliacrilamida com 2,5 ml de Long Ranger (acrilamida/bis-acrilamida); 9 g de uréia; 2,5 ml de TBE (10X); 13 ml de H<sub>2</sub>O; 0,125% de persulfato de amônio e 0,0175% de TEMED, durante 8 horas em tampão TBE.

O seqüenciador semi-automático, modelo Alf Express DNA sequencer 2.1 (Amersham Pharmacia Biotech) foi utilizado na determinação da seqüência de nucleotídeos dos clones selecionados por anti-TESA da biblioteca com  $\lambda$ ZAP Express do *T. cruzi*. A reação de sequenciamento foi realizada com “Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP” e “primers” universais –21 M13 senso, 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3' e M13 anti-senso 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'. A corrida foi realizada em gel de poliacrilamida a 6% com “Reprogel Long Read” em tampão TBE 0,5 X e as condições de corrida foram de 34 watts durante 750 min, na temperatura de aproximadamente 40°C.

### 3.22.3 Análise das seqüências de nucleotídeos

As seqüências de nucleotídeos do DNA dos clones recombinantes selecionados das bibliotecas do *T. cruzi*, foram comparadas com as disponíveis no GenBank, analisadas através do acesso eletrônico localizado no endereço ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn)) e ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blastx](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastx)).



A análise comparativa entre aminoácidos deduzidos das seqüências de DNA dos clones recombinantes isolados com aquelas das proteínas similarmente descritas foi realizada com os programas em software: DNASTAR e Clone Manager 5.

### **3.23 Expressão do antígeno recombinante TESA-1**

A expressão para produção em grande escala, da proteína TESA-1 em fusão com GST foi realizada segundo a técnica descrita por Lew et al. (1991). Para expressão, uma colônia do clone TESA-1 subclonado em pGEX-1 $\lambda$ T foi cultivada em 5 ml de meio LB/amp e incubado durante 18 hs com agitação constante. Como controle de expressão, uma colônia da bactéria transformada com o plasmídeo pGEX foi cultivada e processada nas mesmas condições. As suspensões bacterianas foram inoculadas na proporção de 1/10 em 50 ml de meio LB/amp e as células foram cultivadas a 37°C por 2 hs, com agitação vigorosa de 200 rpm. Na fase exponencial de crescimento, adicionou-se Isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 0,5 mM e as células foram induzidas por um período adicional de 3 h. Após indução, as células foram recolhidas por centrifugação (3.500 x g, 4°C, 10 min) e os sedimentos bacterianos submetidos à solubilização.

Para solubilização, cada sedimento foi ressuspense em 1,2 ml de Tris 10 mM; EDTA 1 mM pH 8,0. Em seguida, a suspensão foi tratada com 2,4 mg de lisozima por 20 min em temperatura ambiente e submetida uma vez ao processo de congelamento e descongelamento. Após a adição de 12  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 2 M e 2,4  $\mu$ g de DNase I, a suspensão foi incubada à temperatura ambiente por 15 min e o sedimento foi eliminado por centrifugação. A fração solúvel do antígeno foi recolhida do sobrenadante e purificada em resina de afinidade (3.24).

### **3.24 Purificação do antígeno recombinante TESA-1 por cromatografia de afinidade**

Para a purificação do antígeno recombinante TESA-1 foi utilizada a resina de afinidade Glutathiona agarose 4B (Amersham Biosciences), descrita por Smith & Johnson (1988). A resina é constituída de agarose com 7-15  $\mu$ mol

de glutationa acoplada por ml de gel drenado, capaz de ligar > 5 mg de glutationa S-transferase.

A purificação foi realizada pelo método "batch" que consiste na adição de 600 µl da resina lavada em PBS com 1200 µl da fração solúvel. Para a adsorção da proteína, a mistura foi mantida sob agitação branda por 5 min e depois lavada 5 vezes em PBS gelado.

A proteína foi eluída em 600 µl de glutationa reduzida (Sigma Chemical Co) (2mg/ml em Tris-HCl 50 mM, pH 9,6) por 5 minutos sob agitação branda. A suspensão foi centrifugada a 500 x g, 5 min e o sobrenadante foi recolhido e reservado. O processo de eluição foi repetido 3 vezes e as eluições foram agrupadas em alíquota única, para dosagem de proteínas. A dosagem de proteínas foi realizada com azul de Coomassie G (Sigma Chemical Co), utilizando o método de Bradford.

### **3.25 Produção de anticorpo policlonal anti-TESA-1**

Coelhos NZW machos, pesando aproximadamente 1 kg, foram inoculados por via subcutânea dorsal com o antígeno recombinante homogeneizado V/V com adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co), na concentração de 100 µg/ml. As doses de reforço foram administradas durante 2 meses, em intervalos quinzenais, na concentração de 100 µg/ml por via intramuscular em adjuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical Co). Após sangria de prova, o soro coletado foi distribuído em alíquotas e estocado a -20°C até o momento de uso.

Anti-Glutationa S-transferase também foi produzida em coelhos utilizando como inóculo, o plasmídeo pGEX induzido com IPTG e purificado por afinidade em glutationa agarose 4B conforme descrito por Cotrim et al., 1990.

### **3.26 Amostras de soros**

Foram analisadas 120 amostras de soros de pacientes chagásicos e não chagásicos. O grupo de pacientes chagásicos foi constituído por pacientes das fases aguda e crônica e com diferentes formas clínicas da Doença de

Chagas crônica. O grupo de não chagásicos foi constituído de indivíduos normais e por pacientes com a leishmaniose visceral.

### **3.26.1 Soros chagásicos:**

Foram provenientes de pacientes que residem em áreas não endêmicas, mas migrantes de diferentes regiões do Brasil, principalmente de áreas endêmicas da doença de Chagas, constituídos por:

- a) 10 pacientes na fase aguda
- b) 80 pacientes na fase crônica
  - 50 assintomáticos
  - 19 com forma cardíaca
  - 11 com forma digestiva

Do total destes pacientes chagásicos, 50% apresentavam xenodiagnóstico positivo e todos os soros foram positivos pela sorologia convencional da doença de Chagas (IFI, ELISA e HAI).

### **3.26.2 Soros não chagásicos:**

Foram coletados de indivíduos normais residentes de área endêmica que apresentavam sorologia negativa para a infecção do *T. cruzi*. Entre os pacientes com outras infecções, os pacientes com leishmaniose apresentavam sorologia convencional (IFI, ELISA) positiva e TESA-blot negativo. Este grupo foi constituído por:

- a) 20 doadores de sangue
- b) 10 pacientes com leishmaniose visceral ativa.

Os soros utilizados foram conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em alíquotas adicionadas de (V/V) de glicerol tamponado pH 7,2, para evitar degradação proteica durante o ciclo de congelamento e descongelamento das amostras.

### 3.27 Análise e caracterização do antígeno recombinante TESA-1 pela técnica de “IMMUNOBLOTTING”

A caracterização imunoquímica do antígeno recombinante TESA-1 foi realizada pela técnica de “Immunoblotting” descrita por Towbin et al. (1979), nas seguintes abordagens:

- confirmar a fusão da proteína recombinante TESA-1 com GST
- verificar a presença do epítipo do recombinante TESA-1 em 8 diferentes cepas de TESA e nas formas evolutivas (tripomastigota, epimastigota e amastigota) do *T. cruzi* com o anticorpo homólogo anti-recombinante TESA-1 produzido em coelhos (item 3.25)
- analisar soros de pacientes chagásicos e não chagásicos com a proteína recombinante TESA-1

Inicialmente, antígenos obtidos do parasita ou isolados de bibliotecas do *T. cruzi* foram solubilizados em tampão de amostra, fervidos a 100°C por 5 min e submetidos à separação eletroforética por SDS-PAGE (item 3.21). Os padrões de alto peso molecular: miosina do músculo de rato - 205,0 kilodaltons (kDa);  $\beta$  galactosidase da *E. coli* - 116 kDa; fosforilase b do músculo de rato - 97,0 kDa; albumina bovina - 66,0 kDa; albumina do ovo - 45,0 kDa (Sigma Co) e de baixo peso molecular: fosforilase b do músculo de rato - 94,0 kDa; albumina bovina - 67,0 kDa; albumina do ovo - 43,0 kDa; anidrase carbônica bovina - 30,0 kDa; inibidor de tripsina da soja - 20,1 kDa e  $\alpha$ -lactoalbumina bovina - 14,4 kDa (Amersham Biosciences) foram preparados conforme recomendações do fornecedor e incluídos em cada gel.

Os antígenos das formas tripomastigota ( $3 \times 10^6$  parasitas/cm<sup>2</sup>), epimastigota ( $1,5 \times 10^6$  parasitas/cm<sup>2</sup>) e amastigota ( $4 \times 10^6$  parasitas/cm<sup>2</sup>) do *T. cruzi*, foram lisados em tampão contendo Nonidet P-40 (10% V/V) e inibidores de protease: aprotinina 1  $\mu$ g/ml, antipaína 1  $\mu$ g/ml, leupeptina 1  $\mu$ g/ml, TLCK (tosyl lysine chloromethyl ketone) 1 mM, PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride) 1 mM e TPCK (tosyl phenyl alanine chloromethyl ketone) 2 mM (Sigma Chemical Co), durante 10 min a 4°C. Decorrido este tempo, as amostras foram diluídas V/V em tampão de amostra e após fervura a 100°C, por 5 min, foram imediatamente submetidas à separação em SDS-PAGE a 7%.

A fração TESA das cepas Y, BS-IMT, DP2, DP3, JBR, CL, G, Tulahuen do *T. cruzi* foi diluída em tampão de amostra na proporção de 4:1 e em seguida, separada eletroforéticamente em gel de SDS-PAGE a 7%.

O antígeno recombinante TESA-1 foi solubilizado em 200  $\mu$ l de tampão de amostra com os inibidores de protease: aprotinina 1  $\mu$ g/ml, antipaína 1  $\mu$ g/ml, leupeptina 1  $\mu$ g/ml, TLCK 1 mM, PMSF 1 mM e TPCK 2 mM (Sigma Chemical Co) e aplicado em gel de SDS-PAGE a 10% na concentração de 112,5  $\mu$ g/ml.

Após a corrida eletroforética em SDS-PAGE, o gel foi transferido para membrana de nitrocellulose com 0,45  $\mu$ m (Schleicher & Schuell) de porosidade, usando o sistema de transferência semi-sêco (Biorad Laboratories) durante 50 min a 2 mA/cm<sup>2</sup>. A membrana foi corada com solução de Ponceau S a 0,5% (Sigma Chemical Co) para verificar a eficiência das proteínas transferidas e, em seguida, bloqueada em PBS-5% de leite desnatado (Molico, Nestle) por 1 h sob agitação moderada. A membrana foi cortada em tiras de 4 mm de largura e submetidas à reatividade de soros diluídos em PBS-1% de leite desnatado durante 16 hs a 4°C sob agitação moderada. As diluições utilizadas foram de 1:3000 para os soros hiperimunes de coelhos anti-TESA-1 e anti-GST e de 1:50 para os soros de pacientes chagásicos e não chagásicos. Após incubação, foram lavadas 3 vezes em PBS e incubadas com conjugado anti-IgG humano-HRP ou anti-IgG de coelho-HRP (Sigma Chemical Co) diluídos em PBS-1% de leite desnatado a 1:4000 e 1:2000 respectivamente. Após novas lavagens em PBS, as tiras foram reveladas com 4-chloro-1-naphthol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a reação foi interrompida com H<sub>2</sub>O. A reação foi considerada positiva quando apresentava bandas de coloração azul púrpura.

## 4. Resultados

### 4.1. Anticorpos eluídos por afinidade ao TESA-blot

A seleção de genes que codificam antígenos excretados-secretados pelo *T. cruzi* foi efetuada das bibliotecas de DNA e de cDNA, construídas respectivamente em  $\lambda$ gt11 e em  $\lambda$ ZAP, com anticorpos anti-TESA purificados por afinidade do TESA-blot (ANEXO 1).

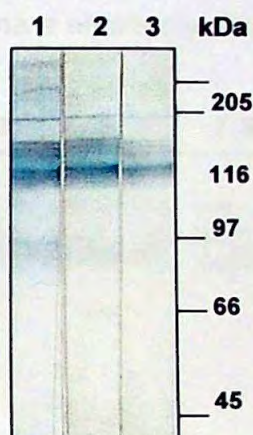
Anti-TESA utilizados na primeira seleção foram purificados de anticorpos presentes em um "pool" de soro de paciente chagásico crônico, que reconheceram proteínas excretadas e secretadas do *T. cruzi*, de um total de aproximadamente 80 TESA-blot. Estes anticorpos foram eluídos de membranas de nitrocelulose, contendo a fração TESA obtida do sobrenadante de culturas de células LLC-MK2 infectadas com *T. cruzi* (cepa Y) e submetida à separação por SDS-PAGE a 7% (item 3.6). O processo de eluição dos anticorpos especificamente ligados à membrana foi realizado três vezes, em volumes de 500  $\mu$ l de Tampão glicina 0,2M, pH 2,6 e as alíquotas correspondentes de cada eluição foram neutralizadas e agrupadas, perfazendo um total de aproximadamente 70 ml/alíquota.

A eficiência da eluição dos anticorpos específicos obtidos por afinidade foi confirmada pela reatividade das alíquotas com a banda de 150-160 kDa presente no TESA-blot da cepa Y. Esta reatividade foi observada nas 3 eluições feitas subsequentemente (Fig. 1, colunas 1, 2 e 3). O controle com o pool de soro chagásico crônico também mostrou o mesmo perfil de reatividade (Fig. 11, TESA, coluna a).

Os anticorpos anti-TESA purificados por afinidade mostraram-se capazes de imunoselecionar clones de uma biblioteca genômica do *T. cruzi*, construída em  $\lambda$ gt11.

Uma maior abordagem foi efetuada na terceira seleção (ANEXO 1) realizada com a biblioteca de cDNA construída em vetor  $\lambda$ ZAP.

Nesta clonagem, além da purificação de anticorpos anti-TESA de soros de pacientes chagásicos de fase crônica, também foram utilizados anticorpos eluídos de soros de pacientes de fase aguda.



**Figura 1** – Análise da eficiência da eluição de anticorpos anti-TESA (eluídos com Tampão glicina pH 2,6) utilizados na seleção gênica (biblioteca construída em  $\lambda$ gt11). As proteínas de 150-160 kDa do TESA-blot (cepa Y) foram reconhecidas pelos anticorpos anti-TESA obtidos em 3 diluições subsequentes. 1. primeira eluição; 2. segunda eluição; 3. terceira eluição dos anticorpos anti-TESA.

Uma outra estratégia nessa seleção, foi a adição de anticorpos eluídos de um soro de paciente chagásico crônico, que não reagia com proteínas expressas por um clone isolado na primeira seleção, da biblioteca genômica, construída em  $\lambda$ gt11.

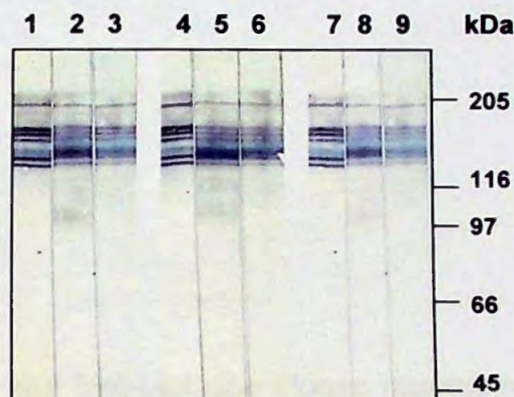
Os anticorpos destes pacientes chagásicos imunoselecionados pelas proteínas excretadas-secretadas do *T. cruzi* foram eluídos e as alíquotas agrupadas por especificidade das fases de infecção da doença de Chagas.

A Figura 2 mostra a reatividade obtida com os anticorpos eluídos por afinidade do TESA-blot de soros de pacientes das fases aguda e crônica da doença de Chagas.

Os anticorpos eluídos de soros de fase aguda mostraram predominantemente o reconhecimento de bandas compreendidas entre

150-220 kDa, correspondentes à Trans-sialidase (TS-SAPA) (Fig. 2, colunas 1, 4 e 7).

Por outro lado, a presença de uma reatividade da banda de 150-160 kDa (Fig. 2, colunas 2, 3, 5, 6, 8 e 9) com anticorpos imunoselecionados de soros de fase crônica confirma a eficiência desta eluição.



**Figura 2** – Eficiência da eluição de anticorpos anti-TESA utilizados na seleção de uma biblioteca de cDNA, construída em  $\lambda$ ZAP. Reatividade no TESA-blot (cepa Y) de anticorpos eluídos por afinidade de soro chagásico: de fase aguda (colunas 1, 4 e 7); de fase crônica (colunas 2, 5 e 8). As colunas (3, 6 e 9) correspondem aos anticorpos eluídos de uma paciente de fase crônica, sem reatividade para uma proteína recombinante obtida na primeira seleção. As colunas correspondentes aos anticorpos eluídos são: 1, 2 e 3 (primeira eluição); 4, 5 e 6 (segunda eluição) e 7, 8 e 9 (terceira eluição).

#### **4.2. Isolamento de clones recombinantes que codificam proteínas excretadas-secretadas pelo *T. cruzi*, utilizando uma biblioteca genômica, construída no bacteriófago de expressão $\lambda$ gt11**

Aproximadamente 3.100 clones da biblioteca de DNA genômico do *T. cruzi*, construída em  $\lambda$ gt11, foram submetidos à seleção com anti-TESA purificado por afinidade (Fig. 1). Desta seleção, um total de 35 clones recombinantes foram isolados da placa com lise bacteriana (item 3.9).

A reatividade dos 35 clones isolados foi confirmada por Dot-Blot (item 3.10) com anticorpos anti-TESA purificados por afinidade. Os clones TESA-1, TESA-3, TESA-5, TESA-6 e TESA-32 mostraram-se mais reativos. Adicionalmente, a reatividade destes clones foram confirmados com soro



hiperimune de coelho inoculado com a proteína recombinante SAPA (shed acute phase antigen - Dr. A. C. C. Frasch, Argentina) que reagiu com os clones TESA-3, TESA-5, TESA-6 e TESA-32 (Fig. 3).

O clone TESA-1 apresentou reatividade com outro soro hiperimune de coelho inoculado com a proteína recombinante de 160 kDa, denominada de Chronic Exoantigen (CEA) (dados não mostrados).

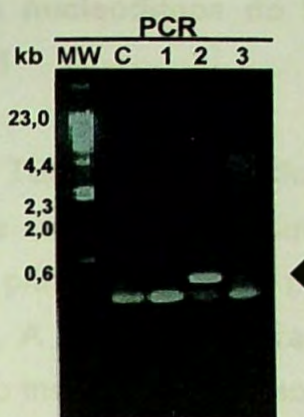


**Figura 3** – Reatividade por Dot-blot dos clones recombinantes isolados da biblioteca genômica do *T. cruzi*, construída em  $\lambda$ gt11. A reatividade dos clones 1. TESA-3; 2. TESA-5; 3. TESA-6 e 4. TESA-32 foram confirmados utilizando o soro anti-recombinante SAPA.

#### 4.2.1 Obtenção do inserto de TESA-1 pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA do clone TESA-1 foi extraído a partir do fago  $\lambda$ gt11 recombinante isolado, para possibilitar a identificação do fragmento gênico (item 3.14.1).

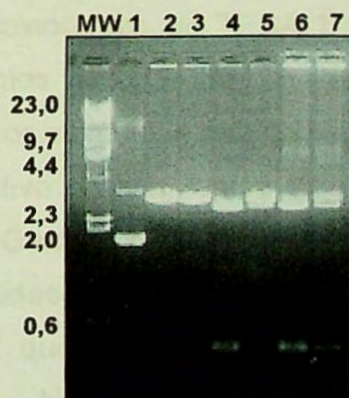
O DNA do clone TESA-1 após digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e submetido à eletroforese não possibilitou a identificação do fragmento do inserto deste clone. A identificação foi obtida por PCR, após amplificação do DNA do inserto de TESA-1 com primers complementares ao  $\lambda$ gt11 (item 3.15). A análise do produto amplificado em gel de agarose 0,8%, mostrou a presença de um fragmento de aproximadamente 0,3 kb, correspondente ao inserto do clone TESA-1 (Fig. 4).



**Figura 4** – Análise do fragmento do clone TESA-1 isolado da biblioteca genômica em  $\lambda$ gt11 (gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio), após amplificação por PCR: 1.  $\lambda$ gt11 controle de vetor, 2. TESA-1, 3. TESA-32, C. controle do PCR. Os marcadores do tamanho molecular (MW) se encontram em kilobases (kb) e a seta indica o fragmento do inserto do clone isolado.

#### 4.2.2 Subclonagem do inserto de TESA-1 em vetor de sequenciamento

O fragmento do inserto amplificado por PCR do clone TESA-1, de aproximadamente 0,3 kb foi purificado do gel de agarose (item 3.17) e ligado ao plasmídeo pGEM-T (item 3.18). A análise do perfil de restrição do DNA do produto ligado e transformado (item 3.19), após a digestão com as enzimas *Apal* e *PstI*, indicou a presença do inserto subclonado em pGEM-T, em 4 das preparações de DNA resultantes da transformação (Fig. 5, colunas 4, 5, 6 e 7).



**Figura 5** – Análise das preparações de DNA obtidas após subclonagem do inserto TESA-1 em plasmídeo de sequenciamento pGEM-T. 1. pGEM-T não digerido, 2-7. DNA das colônias transformantes digeridas com *Apal* e *PstI*.

### 4.2.3 Seqüenciamento de nucleotídeos do DNA do inserto do clone recombinante TESA-1

O DNA do inserto TESA-1 subclonado no plasmídeo pGEM-T foi seqüenciado manualmente e depois confirmado por seqüenciamento semi-automático, utilizando primers universais para as orientações de senso e anti-senso do fragmento. A Figura 6 mostra a seqüência completa dos 203 pbs de nucleotídeos do inserto TESA-1 isolado da biblioteca genômica construída em  $\lambda$ gt11 e amplificado por PCR.

GCG	GAA	TTC	TCT	TTT	GAA	GAC	GGC	AAG	GAG	ATG	TCA	CAG	ACG
Ala	Glu	Phe	Ser	Phe	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Met	Ser	Gln	Thr
GTC	GAC	ACC	GCA	CCG	GGC	AAC	ACA	AGC	ACC	ACG	CCT	GGG	GAA
Val	Asp	Thr	Ala	Pro	Gly	Asn	Thr	Ser	Thr	Thr	Pro	Gly	Glu
ACC	GCG	ATC	CCG	TCG	GAG	TCC	AAC	GCT	ACA	ACA	CCA	TCA	GAC
Thr	Ala	Ile	Pro	Ser	Glu	Ser	Asn	Ala	Thr	Thr	Pro	Ser	Asp
ACT	GAC	ATT	TTG	CTT	GAG	AAC	GTG	CAC	TTG	GGC	GAG	TTG	GCG
Thr	Asp	Ile	Leu	Leu	Glu	Asn	Val	His	Leu	Gly	Glu	Leu	Ala
GCC	ATG	TCT	CTA	ATT	GGT	GAC	AGC	ACC	GTG	CAG	GA		
Ala	Met	Ser	Leu	Ile	Gly	Asp	Ser	Thr	Val	Gln	Glu		

**Figura 6** - Seqüenciamento completo do inserto do clone TESA-1 A seqüência de aminoácidos deduzida à partir da seqüência de nucleotídeos está representada. AF438316: *accession number* ao GenBank.

### 4.2.4 Análise comparativa da seqüência do TESA-1

A seqüência de nucleotídeos de TESA-1 apresentou alta homologia com moléculas pertencentes ao Grupo III da família Trans-sialidase, constituído principalmente por moléculas que codificam proteínas de 160 kDa.

A análise comparativa da seqüência de nucleotídeos com àquelas atualmente disponíveis no *GenBank* mostrou uma alta homologia com duas moléculas de gp85/sialidase (M91469 e M91470), consideradas pseudogenes do *T. cruzi* que apresentaram 91% de similaridade com TESA-1. Foi observada também relevante homologia da região carboxi-terminal de moléculas que codificam proteínas de 160 kDa, como a CRP-10 (U59297) denominada de proteína regulatória do complemento e o antígeno flagelar FL-160-1 (M65032) do *T. cruzi* que apresentaram

respectivamente 86% e 85% de similaridade com TESA-1. Além disso, uma significativa homologia de TESA-1 foi encontrada com uma região similarmente compartilhada pelos genes FL-160-2 (X70948), FL-160-3 (X70949) e FL-160-4 (X70950), localizada também na porção carboxi-terminal destas moléculas codificadoras de proteínas com PM de 160 kDa (Fig. 7).

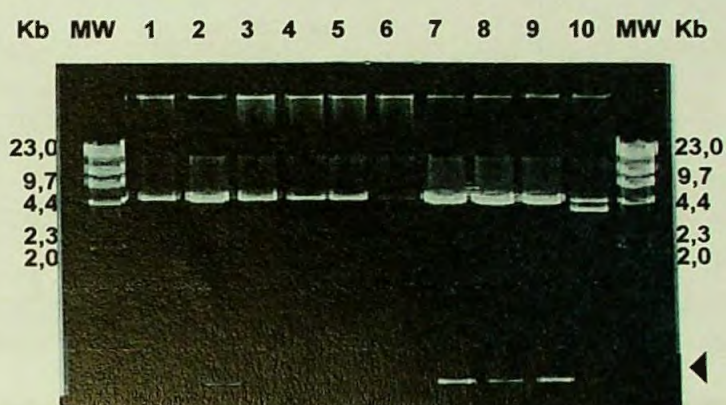
1	Ala	Glu	Phe	Ser	Phe	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Met	Ser	Gln	Thr	TESA-1
1	GCG	GAA	TTC	TCT	TTT	GAA	GAC	GGC	AAG	GAG	ATG	TCA	CAG	ACG	
82	-	Glu	Phe	Ser	Val	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Val	Pro	Gln	Thr	gp85 M91469
247	- - -	GAA	TTT	TCT	GTT	GAG	GAC	GGC	AAG	GAG	GTG	CCA	CAG	ACG	
893	-	-	-	-	Leu	Lys	Thr	Ala	Arg	Lys	Cys	His	Arg	Arg	gp85 M91470
2881	- - -	- - -	- - -	- - -	TTG	AAA	ACG	GCA	AGG	AAG	TGC	CAC	AGA	CGG	
1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CRP-10
3047	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
302	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FL-160-1
908	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
15	Val	Asp	Thr	Ala	Pro	Gly	Asn	Thr	Ser	Thr	Thr	Pro	Gly	Glu	TESA-1
43	GTC	GAC	ACC	GCA	CCG	GGC	AAC	ACA	AGC	ACC	ACG	CCT	GGG	GAA	
95	Val	Asp	Thr	Ala	Pro	Gly	Asn	Thr	Asn	Thr	Thr	Pro	Gly	Glu	gp85 M91469
286	GTC	GAC	ACC	GCA	CCG	GGC	AAC	ACA	AAC	ACC	ACG	CCT	GGG	GAA	
900	Ser	Thr	Pro	His	Arg	Ala	Ile	Gln	Thr	Pro	Arg	Leu	Gly	Lys	gp85 M91470
2711	TCC	ACA	CCG	CAC	CGG	GCA	ATA	CAA	ACA	CCA	CGC	CTG	GGG	AAA	
1015	-	-	-	-	-	-	-	-	Ala	Gln	Arg	Leu	Gly	Lys	CRP-10
3047	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	GCA	CAA	CGC	CTG	GGG	AAA	
302	-	-	-	-	-	-	-	-	Ala	Gln	Arg	Leu	Gly	Lys	FL-160-1
908	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	GCA	CAA	CGC	CTG	GGG	AAA	
29	Thr	Ala	Ile	Pro	Ser	Glu	Ser	Asn	Ala	Thr	Thr	Pro	Ser	Asp	TESA-1
65	ACC	GCG	ATC	CCG	TCG	GAG	TCC	AAC	GCT	ACA	ACA	CCA	TCA	GAC	
109	Thr	Lys	Ile	Pro	Ser	Glu	Ser	Asn	Ala	Thr	Thr	Pro	Ser	Asp	gp85 M91469
328	ACC	AAG	ATC	CCG	TCG	GAG	TCC	AAC	GCA	ACA	ACC	CCC	TCG	GAC	
814	Pro	-	ter	Ser	His	Arg	Ser	Pro	Thr	Gln	Gln	His	His	Gln	gp85 M91470
2753	CCA	- - -	TGA	TCC	CAT	CGG	AGT	CCA	ACG	CAA	CAA	CAC	CAT	CAG	
1021	Pro	Arg	Ser	His	Arg	Ser	Pro	Thr	Pro	Gln	Tyr	Pro	Trp	Lys	CRP-10
3085	CCA	AGA	TCC	CAT	CGG	AGT	CCA	ACG	CCA	CAA	TAC	CCT	TGG	ACC	
308	Pro	Arg	Ser	His	Arg	Ser	Pro	Thr	Pro	His	Arg	Ser	Arg	Thr	FL-160-1
926	CCA	AGA	TCC	CAT	CGG	AGT	CCA	ACG	CCA	CAT	CGC	TCT	CGG	ACC	
43	Thr	Asp	Ile	Leu	Leu	Glu	Asn	Val	His	Leu	Gly	Glu	Leu	Ala	TESA-1
127	ACT	GAC	ATT	TTG	CTT	GAG	AAC	GTG	CAC	TTG	GGC	GAG	TTG	GCG	
123	Thr	Asp	Ile	Leu	Leu	Glu	Lys	Gly	His	Leu	Gly	Glu	Leu	Ala	gp85 M91469
370	ACT	GAC	ATT	TTG	CTT	GAG	AAG	GGG	CAT	TTG	GGC	GAG	TTG	GCG	
827	Thr	Leu	Thr	Phe	-	-	-	-	-	Cys	Leu	Ser	-	-	gp85 M91470
2792	ACA	CTG	ACG	TTT	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	TGC	TTG	A G	-	-	
1035	Leu	Ser	Phe	Cys	Leu	Ser	Thr	Gly	Ile	-	ter	Ala	Ile	Trp	CRP-10
3107	CTG	TCA	TTT	TGC	TTG	AGC	ACG	GGC	ATT	- - -	TGA	GCG	ATT	TGG	
322	Met	Thr	Phe	Cys	Leu	Ser	Thr	Gly	Ile	-	ter	Ala	Ile	Trp	FL-160-1
968	ATG	ACA	TTT	TGC	TTG	AGC	ACG	GGC	ATT	- - -	TGA	GCG	ATT	TGG	
57	Ala	-	Met	Ser	Leu	Ile	Gly	Asp	Ser	Thr	Val	Gln	Glu	-	TESA-1
169	GCC	- - -	ATG	TCT	CTA	ATT	GGT	GAC	AGC	ACC	GTG	CAG	GA	-	
137	Ala	-	Met	Tyr	Leu	Ile	Gly	Asp	Ser	Thr	Val	Gln	-	-	gp85 M91469
412	GCC	- - -	ATG	TAT	CTA	ATT	GGT	GAC	AGC	ACC	GTG	CA	-	-	gp85 M91470
934	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2810	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1018	Arg	Pro	Trp	- - -	Leu	ter	Leu	Val	Thr	Ala	Pro	Cys	Ser	-	CRP-10
3148	CGT	CCA	TGG	- - -	CTC	TAA	TTG	GTG	ACA	GCA	CCG	TGC	A	-	
335	Arg	Pro	Trp	-	Leu	ter	Leu	Val	Thr	Ala	Pro	Cys	Ser	-	FL-160-1
1007	CGT	CCA	TGG	- - -	CTC	TAA	TTG	GTG	ACA	GCA	CCG	TGC	A	-	

**Figura 7** – Análise comparativa das sequências de nucleotídeos e da sequência deduzida de aminoácidos do clone TESA-1 (AF438316) com moléculas homólogas do Grupo III da Família Trans-sialidase. As moléculas CRP (U59297) e FL-160-1 (M65032) do Grupo III codificam proteínas de 160 kDa.

#### 4.2.5 Subclonagem do inserto recombinante em vetor de expressão pGEX

O DNA do inserto de TESA-1 foi subclonado em plasmídeo pGEX-1 $\lambda$ T e transformado em *E. coli* DH5 $\alpha$  (itens 3.18 e 3.19).

A análise em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, do DNA do produto transformado e digerido com a enzima *Eco*RI, mostrou o tamanho esperado do inserto de TESA-1, nas preparações de DNA extraído das colônias 2, 7, 8 e 9 (Fig. 8).



**Figura 8** – Análise do DNA do inserto de TESA-1, subclonado em vetor de expressão pGEX-1 $\lambda$ T, por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. 1. pGEX digerido com *Eco*RI, 2-10. DNA das colônias subclonadas em pGEX. A seta indica o fragmento do inserto TESA-1 e nas extremidades se encontram os marcadores de tamanho moleculares em kilobases.

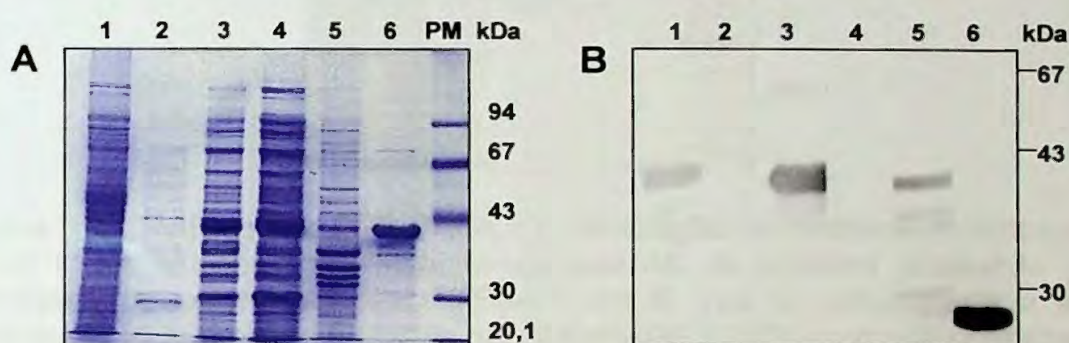
A produção da proteína recombinante TESA-1 foi obtida em *E. coli*, pela indução da expressão do inserto subclonado em pGEX-1 $\lambda$ T, com IPTG (item 3.23).

As proteínas em fusão com a GST, expressas em pGEX-1 $\lambda$ T-TESA-1, foram solubilizadas e posteriormente identificadas em gel de SDS-PAGE (10%), corado com azul de Coomassie R (item 3.21) (Fig. 9A, colunas 3 e 4).

A análise por SDS-PAGE identificou a expressão da proteína TESA-1 produzida em fusão com a GST na banda com PM de aproximadamente 38 kDa. O PM da proteína TESA-1 expressa foi de aproximadamente 10 kDa, correspondente à diferença entre o PM de TESA-1 em fusão com a GST (38 kDa) e do PM da GST de 27,5 kDa. Este PM mostrou ser compatível com a fase de leitura aberta do fragmento de 203 pbs, do inserto do clone TESA-1.

A proteína purificada, TESA-1 em fusão com GST (item 3.24), apresentou reatividade com soros de pacientes chagásicos de fase aguda e crônica por Immunoblotting (Fig. 9B, colunas 1 e 3). Nenhuma reatividade da proteína GST foi encontrada com estes soros (Fig. 9B, colunas 2 e 4).

Por outro lado, as proteínas TESA-1 recombinante e GST (Fig. 9B, colunas 5 e 6) foram reconhecidas pelo soro hiperimune de coelho anti-GST, indicando a fusão do inserto com o gene da GST, presente no vetor de expressão pGEX.



**Figura 9** – Análise por SDS-PAGE e por Immunoblotting da proteína TESA-1 em fusão com a GST, produzida pela expressão de pGEX-TESA-1 em *E. coli* DH5 $\alpha$ . **A.** SDS-PAGE (10%) corado com azul de Coomassie R. 1. *E. coli* DH5 $\alpha$  (controle negativo), 2. pGEX (controle negativo), 3 e 4. lisado bacteriano de TESA-1, 5. lisado após purificação e 6. fração de TESA-1 eluída com glutathiona reduzida. **B.** Immunoblotting com soro chagásico e soro anti-GST. 1, 3 e 5. fração de TESA-1 em fusão com GST, 2, 4 e 6. GST, 1 e 2. soro de paciente chagásico agudo, 3 e 4. soro de paciente chagásico crônico e 5 e 6. Soro hiperimune de coelho anti-GST.

#### 4.2.6 Purificação da proteína TESA-1, produzida em *E. coli* pela expressão em pGEX-TESA-1, por afinidade à glutathiona-agarose 4B

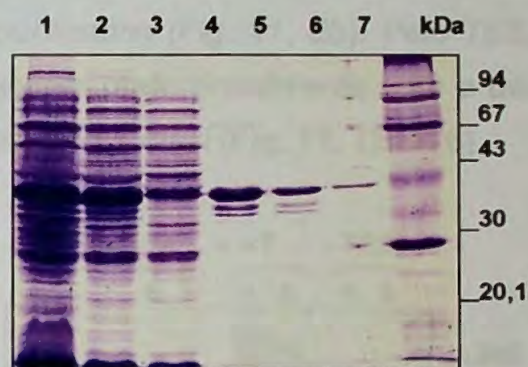
A proteína recombinante TESA-1 em fusão com a GST foi produzida em grande escala pela expressão do vetor pGEX-TESA-1 em *E. coli* e purificada em resina de afinidade glutathiona-agarose 4B.

A eficiência da purificação da proteína TESA-1 foi analisada no gel de SDS-PAGE, corado com Coomassie Blue R.

As alíquotas purificadas por afinidade à glutathiona-agarose e obtidas após três eluições consecutivas com a glutathiona reduzida (Fig. 10, colunas 4, 5 e 6), mostraram que a proteína TESA-1 é abundantemente expressa e altamente

solúvel, podendo ser facilmente recuperada, sem a necessidade do uso de agentes químicos desnaturantes (item 3.24).

A dosagem da concentração proteica, realizada pelo método Bradford, mostrou que o rendimento aproximado da proteína purificada é de 3-5 mg por litro de cultura.



**Figura 10** – Análise por SDS-PAGE da purificação da proteína recombinante TESA-1 por afinidade à glutatona-agarose 4B. A proteína produzida pela expressão do plasmídeo pGEX-TESA-1 em *E. coli* foi solubilizada e após purificação foi submetida à corrida em SDS-PAGE à 10% e corada com azul de Coomassie R. Análise dos lisados bacterianos contendo TESA-1: 1-3; frações eluídas com glutatona reduzida: 4-6 e vetor pGEX (controle): 7.

#### 4.2.7 Expressão do peptídeo recombinante TESA-1 nas diferentes formas evolutivas e na fração TESA de várias cepas do *T. cruzi*

Anticorpos da classe IgG presentes no soro de pacientes chagásicos crônicos mostram o reconhecimento de vários polipeptídeos dos extratos totais das formas epimastigota, amastigota e tripomastigota do *T. cruzi*, por immunoblotting. O perfil da reatividade destes antígenos (Fig. 11) mostrou o reconhecimento de polipeptídeos tanto de alto como de baixo peso molecular no Immunoblotting de formas amastigotas e tripomastigotas (Fig.11, Aa, Ta). Estes mesmos soros reconheceram polipeptídeos somente de baixo peso molecular no Immunoblotting de formas epimastigotas (Fig. 11, Ea). No TESA-blot, da cepa Y, o soro de paciente chagásico crônico reconheceu as bandas de 150-160kDa, de 97kDa e àquelas correspondentes ao do antígeno SAPA (Ta).

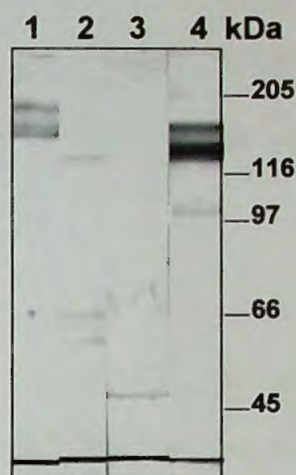
Por outro lado, anticorpos anti-TESA purificados de um "pool" de soros de pacientes chagásicos crônicos, imunoselecionados do TESA-blot, reagiram com vários polipeptídeos, incluindo a banda de 150-160 kDa, presentes no Immunoblotting de tripomastigotas e amastigotas (Fig. 11, Ab e Tb). O Immunoblotting de epimastigotas não demonstrou nenhuma reatividade com os anticorpos anti-TESA purificados (Fig. 11, Eb). Pelo TESA-blot, os anticorpos imunoselecionados reagiram preferencialmente com a banda de 150-160 kDa da fração TESA da cepa Y do *T. cruzi* (Fig. 11, TESA b).



**Figura 11.** Immunoblotting das formas evolutivas: epimastigota (E), amastigota (A) e tripomastigota (T) e na fração TESA do *T. cruzi*, cepa Y. Perfil da antigenicidade destes antígenos com soro de paciente chagásico crônico (a) e anticorpos anti-TESA eluídos de soro de paciente chagásico crônico (b).

A presença do epítipo que expressa o peptídeo recombinante TESA-1 foi verificada em diferentes formas evolutivas (epimastigota, amastigota e tripomastigota) e na fração TESA de 8 cepas do *T. cruzi*, utilizando-se do soro hiperimune de coelho anti-TESA-1. Os soros hiperimunes anti-TESA-1 foram obtidos pela imunização de coelhos com a proteína de fusão purificada por afinidade à glutathiona-agarose 4B (item 3.25).





**Figura 12** – Immunoblotting das formas tripomastigota (1), amastigota (2), epimastigota (3) e na fração TESA (4) do *T. cruzi*, cepa Y com soro hiperimune de coelho anti-recombinante TESA 1.

A Figura 12 mostra o perfil de reatividade do soro anti-TESA-1 nas diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*. O soro hiperimune anti-TESA-1 reagiu com a banda de 150-160 kDa presente no Immunoblotting de tripomastigotas (coluna 1) e com um polipeptídeo de PM de 120 kDa em amastigotas (coluna 2) e não reagiu com polipeptídeos das formas epimastigotas do *T. cruzi* (coluna 3).

Estes resultados mostraram que os anticorpos homólogos à proteína recombinante, anti-TESA-1, reagiram com epítomos do *T. cruzi*, semelhantemente à reatividade do anti-TESA imunoselecionado de pacientes chagásicos crônicos, observada com os extratos totais do parasita (Fig. 11).

O epítomo que expressa o peptídeo recombinante TESA-1 foi identificado na fração TESA de 8 cepas do *T. cruzi*. Como mostra a figura 13B, a banda de 150-160 kDa foi fortemente reconhecida pelo soro do paciente chagásico crônico presente nas cepas Y, CL, G e Tulahuen (Fig. 13B, colunas 1, 6, 7 e 8) e nos isolados BS-IMT, DP2, DP3 e JBR (Fig. 13B, colunas 2, 3, 4 e 5). Uma outra banda, não considerada neste estudo, com PM de 97 kDa, também foi reconhecida por algumas cepas do *T. cruzi* (isolados BS-IMT, DP2 e DP3).



**Figura 13** – Análise por Immunoblotting do perfil de reatividade de 8 cepas e isolados do *T. cruzi* com soro hiperimune de coelho anti-recombinante TESA-1 (A) e soro de paciente chagásico crônico (B). As proteínas excretadas e secretadas no sobrenadante de cultura das cepas e isolados: 1 – Y; 2 – BS-IMT; 3 – DP2; 4 – DP3; 5 – JBR; 6 – CL; 7 – G e 8 – Tulahuen do *T. cruzi* foram separadas por SDS-PAGE e submetidas ao Immunoblotting. Os marcadores de peso molecular se encontram à esquerda.

O soro hiperimune anti-recombinante TESA-1 também reagiu com uma banda de 150-160 kDa presente em todas as cepas e isolados do *T. cruzi* (Fig.13A, colunas 1-8). Estes resultados confirmaram a presença do epítipo de TESA-1 na banda de 150-160 kDa da fração TESA de diferentes cepas do *T. cruzi*.

#### 4.2.8 Análise por Immunoblotting, da eficiência diagnóstica da proteína recombinante TESA-1, na doença de Chagas

Uma avaliação imunodiagnóstica da proteína recombinante TESA-1 foi efetuada por Immunoblotting, através da detecção de anticorpos IgG presentes em soros de pacientes chagásicos e não chagásicos.

O grupo de pacientes chagásicos consistiu de soros de pacientes crônicos assintomáticos e com comprometimento clínico (cardíaco e megaesôfago) (item 3.26) e de soros de pacientes de fase aguda. O grupo dos não chagásicos foi constituído por soros de indivíduos considerados normais e de pacientes acometidos por leishmaniose.

Os dados da avaliação imunodiagnóstica, em porcentagem de reatividade ao antígeno recombinante TESA-1 estão apresentados na Tabela 1, com os diferentes grupos de pacientes chagásicos e não chagásicos.

**Tabela 1** - Análise por Immunoblotting, da reatividade da proteína recombinante TESA-1 com anticorpos IgG de soros de pacientes chagásicos e não chagásicos

AMOSTRAS		Immunobotting		
		Antígeno TESA-1 recombinante		TESA
Grupos	Formas clínicas	<i>n</i>	P% <i>n</i> +	P%
<b>CHAGÁSICOS</b>	Agudos	10	100% (10)	100
	Cardíacos	19	84,2 (16)	100
	Digestiva	11	90,9 (10)	100
	Assintomáticos	50	78,0 (38)	100
<b>NÃO CHAGÁSICOS</b>	Normal	20	0	0
	Leishmaniose	10	20,0 (2)	0

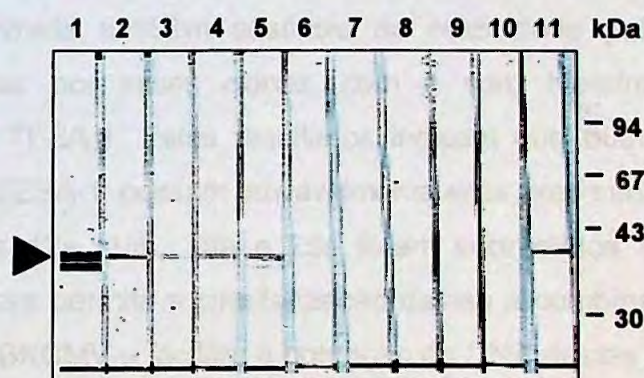
Sensibilidade = 0,822

Especificidade = 0,933

Os soros dos pacientes chagásicos crônicos, com a forma digestiva da doença de Chagas, apresentaram uma positividade de 90,9%, os cardíacos 84,2% e os assintomáticos 78,0% de positividade. Nenhuma correlação foi encontrada entre a reatividade da proteína recombinante TESA-1 e as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Considerando-se o número total de pacientes chagásicos crônicos, 64 dos 80 soros analisados, reagiram com a proteína recombinante TESA-1. Os soros de pacientes chagásicos agudos apresentaram 100% de positividade.

Uma reatividade cruzada com a proteína recombinante TESA-1 foi observada com 2 soros de pacientes com leishmaniose. Os padrões de reatividade sorológica obtidos por Immunoblotting realizados com soros de pacientes chagásicos crônicos foram semelhantes aos ilustrados na Figura 14 (colunas 1-5) e aos de 5 soros não chagásicos (Fig. 14, colunas 6-10). Nesta análise, a proteína GST de 27,5 kDa incluída como controle de reação, apresentou ausência de reatividade em todos os soros testados por Immunoblotting (não ilustrado). A análise por Immunoblotting da proteína recombinante TESA-1 mostrou uma sensibilidade de 82,2% e uma especificidade de 93,3%.



**Figura 14** – Análise por Immunoblotting da proteína recombinante TESA-1 purificada por afinidade à Glutathiona agarose 4B. As amostras: **1 a 5** - soro de pacientes chagásicos crônicos; **6 a 10** - soro de indivíduos não chagásicos e **11** - soro hiperimune de coelho anti-TESA-1 recombinante. A seta indica a reatividade da proteína recombinante TESA-1.

#### **4.3 Isolamento de clones recombinantes selecionados por sonda radioativa da biblioteca de cDNA do *T. cruzi*, construída em $\lambda$ ZAP**

Uma segunda seleção foi efetuada, utilizando como sonda, uma sequência do inserto do clone que codifica a proteína recombinante TESA-1.

Um total de aproximadamente 48.000 clones de uma biblioteca de cDNA do *T. cruzi*, construída em  $\lambda$  ZAP Express, foram selecionados com a sonda do inserto do clone TESA-1, marcada com  $^{32}\text{P}$ .

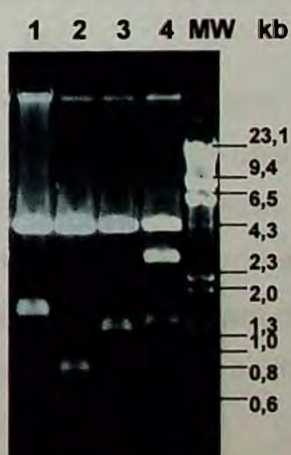
A autoradiografia auxiliou na identificação dos clones hibridizados com a sonda do TESA-1, coincidindo-se os sinais positivos obtidos após a revelação do filme de Raio X, com as lises que originaram a réplica das membranas empregadas na reação de hibridização.

Um total de 34 clones recombinantes foram isolados e 4 deles (12a, 15b, 16a e 25a) apresentaram maior intensidade de hibridização, após 3 ciclos de reisolamento confirmados com a sonda do TESA-1.

As proteínas expressas pelos clones 15b e 16a, após indução com IPTG, mostraram pelo Dot-blot fraca reatividade com anticorpos anti-TESA, imunoselecionados de soros chagásicos crônicos. Nenhuma reatividade destes anticorpos foi observada com as proteínas expressas pelos clones 12a e 25a.

Foi encontrada também ausência de reatividade pelo Dot-blot, das proteínas induzidas por esses clones, com o soro hiperimune de coelho anti-recombinante TESA-1. Estes resultados indicam que outros epítomos não relacionados com TESA-1, possam provavelmente estar presentes nestes clones.

Os clones 12a, 15b, 16a e 25a foram submetidos ao processo de excisão *in vivo*, para permitir a circularização destes recombinantes fágicos no vetor plasmídeo pBKCMV e facilitar a obtenção do DNA destes insertos.



**Figura 15** – Análise por eletroforese em gel de agarose a 2% do DNA dos clones isolados por sonda da biblioteca de cDNA em  $\lambda$ ZAP. Os clones fágicos foram convertidos em fagemídeos pBK-CMV por excisão *in vivo* e o DNA digerido com as enzimas de restrição *Pst*I e *Eco*RI foi analisado. 1. TESA 25a; 2. TESA 12a; 3. TESA 15b; 4. TESA 16a. Os padrões de tamanho molecular representados em kilobases (MW) se encontram na extremidade direita.

A análise por eletroforese em gel do DNA dos clones digeridos com as enzimas de restrição *Pst*I e *Eco*RI (Fig. 15) apresentaram fragmentos com diferentes padrões de restrição, com insertos de aproximadamente 1,5 kb. O clone 25a apresentou apenas um fragmento de aproximadamente 1,5 kb (Fig. 15, coluna 1) e o clone 15b mostrou dois fragmentos, de 1,3 e 0,2 kb (Fig. 15 coluna 3). O clone 12a (Fig. 15 coluna 2) apresentou dois fragmentos, de 0,8 e 0,7 kb. Somente o clone 16a (Fig. 15 coluna 4) apresentou fragmentos de aproximadamente 3,0 kb e 1,4 kb, totalizando um inserto com 4,4 kb.

#### **4.3.1 Análise das sequências dos clones recombinantes selecionados com a sonda do TESA-1**

O DNA dos insertos dos clones selecionados com a sonda do TESA-1 (AF438316) foram parcialmente sequenciados. Um total de 441 pbs foram sequenciados do clone 12a; 766 pbs do clone 15b, 807 pbs do clone 25a e 448 pbs do clone 16a (as sequências encontram-se nos anexos).

A análise pelo *GenBank* da sequência de nucleotídeos destes clones possibilitou a identificação de todos estes isolados com o gene CAI Tc13 (M92046) do Grupo IV, pertencente à família Trans-sialidase do *T. cruzi*. Esta homologia foi consistentemente observada com a região carboxi-terminal do gene CAI Tc13 que mostrou ser 86-91% similar com a extremidade 5' dos clones 12a, 15b, 16a e 25a (Fig. 16).

Por outro lado, uma homologia relevante também foi verificada na extremidade 3' destes clones com a região carboxi-terminal da gp85/sialidase (M91469) e (M91470). Estes resultados foram compatíveis com a alta similaridade encontrada pela sequência da sonda do TESA-1, por esta região da gp85/sialidase. Dados mais consistentes foram obtidos com a sequência de nucleotídeos do clone 25a que demonstrou similaridade com a sonda do TESA-1 e com a gp85/sialidase, CRP e FL-160.

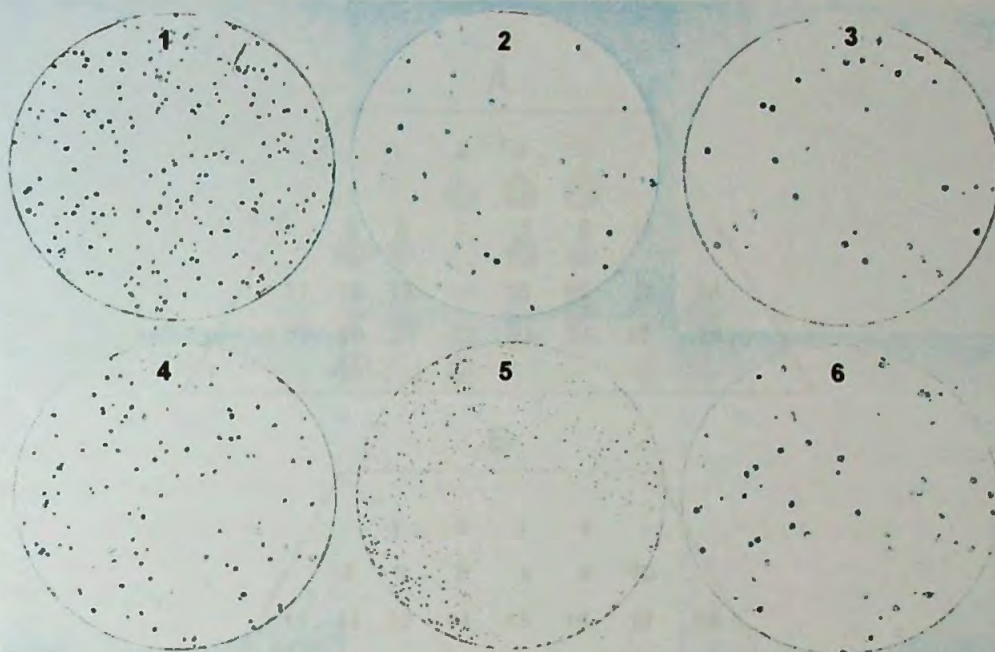
16	-	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Ile	Lys	-	ter	Arg	Asp	Ser	Arg	CLONE 12a
49	---	GCT	GCG	CTC	ACT	CTC	CCA	ATA	AAG	---	TGA	CGC	GAC	TCC	CGT	
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	His	-	-	-	-	CLONE 15b
43	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	CAT	---	---	---	---	
27	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	CLONE 16a
82	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
1	Phe	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Met	Lys	-	ter	Arg	Asp	Ser	Arg	CLONE 25a
4	TTT	GCT	GCG	CTC	ACT	CTC	CCG	ATG	AAG	---	TGA	CGC	GAC	TCC	CGT	
619	Phe	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Met	Glu	-	ter	Arg	Asp	Ser	Arg	CAI Tc 13
1857	TTT	GCT	GCG	CTC	ACT	CTC	CCG	ATG	GAG	---	TGA	CGC	GAC	TCC	CGC	
29	His	Val	Cys	Val	Leu	Leu	Ser	Val	His	Thr	His	Thr	Ser	Asp	Tyr	CLONE 12a
88	CAT	GTC	TGC	GTT	CTT	CTC	TCA	GTC	CAC	ACA	CAC	ACG	AGT	GAC	TAT	
15	Val	Cys	Val	Leu	Leu	Ser	Val	Pro	Thr	Tyr	Thr	Arg	Val	Thr	Met	CLONE 15b
46	GTC	TGC	GTT	CTT	CTC	TCA	GTC	CCC	ACC	TAC	ACC	CGA	GTG	ACT	ATG	
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Asp	Cys	Ala	CLONE 16a
82	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	GAC	TGT	GCT
15	His	Val	Cys	Val	Leu	Leu	Ser	Val	Pro	Thr	His	Thr	Ser	Asp	Cys	CLONE 25a
46	CAT	GTC	TGC	GTG	CTT	CTC	TCA	GTC	CCC	ACA	CAC	ACG	AGT	GAC	TGT	
633	His	Val	Cys	Val	Pro	Leu	Ser	Val	Pro	Thr	Tyr	Thr	Arg	Val	Thr	CAI Tc 13
1899	CAT	GTC	TGC	GTG	CCT	CTC	TCA	GTC	CCC	ACA	TAC	ACA	CGA	GTG	ACT	
44	Ala	Leu	Arg	Ala	Ala	Leu	Thr	Arg	-	Arg	-	ter	-	Glu	Gly	CLONE 12a
133	GCT	CTG	CGG	GCC	GCA	CTC	ACA	CGC	---	CGA	---	TGA	---	GAG	GGC	
30	Leu	Cys	Gly	Pro	His	Ser	His	Ala	Asn	Glu	Arg	Ala	Glu	Gly	Ser	CLONE 15b
91	CTT	TGC	GGG	CCG	CAC	TCA	CAC	GCC	AAT	GAA	AGG	GCT	GAG	GGG	AGC	
30	Leu	Arg	Ala	Ala	Leu	Thr	His	Gln	-	ter	-	Thr	Ala	Glu	Gly	CLONE 16a
91	CTG	CGG	GCC	GCA	CTC	ACG	CAC	CAA	---	TAA	---	ACC	GCT	GAG	GGG	
30	Ala	Leu	Arg	Ala	Ala	Leu	Thr	His	-	Gln	-	ter	-	Asn	Gly	CLONE 25a
91	GCT	CTG	CGG	GCC	GCA	CTC	ACG	CAC	---	CAA	---	TAA	---	AAC	GGC	
649	Val	Leu	Cys	Gly	Pro	His	Ser	Arg	Ala	Asp	Gly	Arg	Ala	Glu	Gly	CAI Tc 13
1944	GTG	CTC	TGC	GGG	CCG	CAC	TCA	CGC	GCC	GAT	GGG	AGG	GCT	GAG	GGG	
56	ter	Gly	Glu	Gln	Gln	His	Ala	Asp	Asp	Pro	Met	Lys	Tyr	Lys	Arg	CLONE 12a
169	TGA	GGG	GAG	CAG	CAA	CAC	GCA	GAT	GAC	CCC	ATG	AAA	TAT	AAA	CGA	
45	Ser	Asn	Thr	Ala	Asp	Asp	Pro	Met	Lys	Tyr	Lys	Arg	Cys	Ala	Val	CLONE 15b
136	AGC	AAC	ACC	GCA	GAT	GAC	CCC	ATG	AAA	TAT	AAA	CGA	TGT	CGC	GTC	
43	Ser	Thr	Ser	Thr	Gln	Met	Thr	-	Pro	ter	Asn	Ile	-	Asn	Ala	CLONE 16a
130	AGC	ACC	AGC	ACG	CAG	ATG	ACC	---	CCA	TGA	AAT	ATA	---	AAC	GCT	
42	ter	Gly	Glu	Gln	Gln	His	Ala	Asp	Asp	Pro	Met	Lys	Tyr	Lys	Arg	CLONE 25a
127	TGA	GGG	GAG	CAG	CAG	CAC	GCA	GAT	GAC	CCC	ATG	AAA	TAT	AAA	CGC	
663	Ser	Ser	Asn	Thr	Gln	Met	Thr	-	Pro	ter	Asn	-	-	Ile	Asn	CAI Tc 13
1989	AGC	AGC	AAC	ACG	CAG	ATG	ACC	---	CCA	TGA	AAT	---	---	ATA	AAC	

**Figura 16** – Análise comparativa da sequência de nucleotídeos e da sequência deduzida de aminoácidos dos clones 12a, 15b, 16a e 25a selecionados com a sonda do TESA-1 (AF438316) com o gene CAI Tc13 (M92046) do grupo IV da Família Trans-sialidase do *T. cruzi*.

#### 4.4 Isolamento de clones recombinantes que codificam proteínas excretadas-secretadas do *T. cruzi* de uma biblioteca em $\lambda$ ZAP selecionada com anticorpos anti-TESA

Uma terceira seleção foi realizada de uma biblioteca construída em vetor de expressão  $\lambda$ ZAP com cDNA do *T. cruzi*. Os clones foram selecionados com anticorpos anti-TESA imunoselecionados por afinidade ao TESA-blot (item 3.7.2).

Os anticorpos anti-TESA utilizados nesta seleção foram purificados de um "pool" de soros chagásicos com infecção aguda e crônica da doença de Chagas, incluindo o soro de um paciente chagásico crônico que não reagia com a proteína recombinante TESA-1 (Fig. 2).

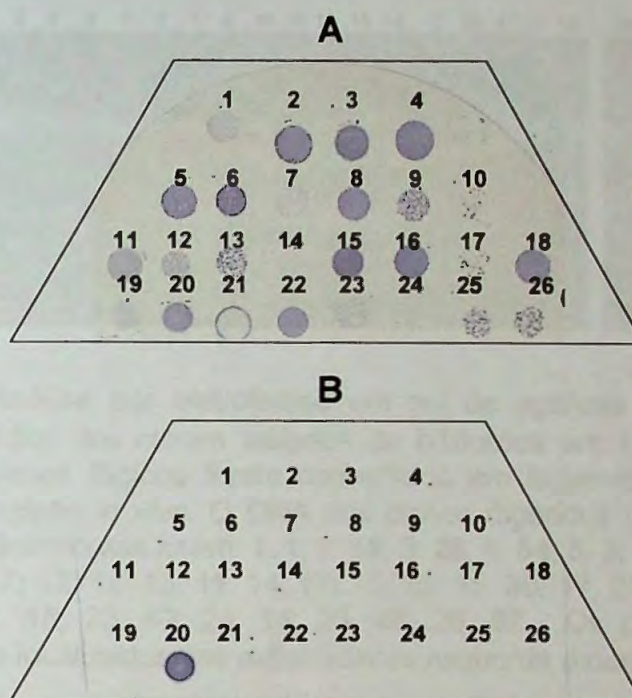


**Figura 17** – Representação de alguns clones positivos (1, 2, 3, 4, 5 e 6) durante o isolamento. Todos os clones selecionados foram plaqueados e reisolados até que 100% das lises nas réplicas em nitrocelulose fossem confirmadas com anticorpos anti-TESA eluídos de soros de pacientes com infecção aguda e crônica da doença de Chagas.

Os isolamentos dos clones positivos foram feitos, a partir da placa de lise, que deu origem à réplica em nitrocelulose (NTC) contendo as proteínas recombinantes induzidas com IPTG. Os sinais positivos foram obtidos da imunoreatividade dos anticorpos anti-TESA com as proteínas recombinantes adsorvidas na NTC (item 3.9).

Foram isoladas todas as placas de lise correspondentes aos sinais positivos dos clones. Cada clone foi plaqueado individualmente e submetido a um novo ciclo de reisolamento. Os ciclos de reisolamentos prosseguiram até que 100% das placas de lise fossem reconhecidas pelos anticorpos anti-TESA imunoselecionados, para assegurar a pureza dos clones. Na Figura 17 estão representados 6 dos clones obtidos desta clonagem durante o ciclo de reisolamento.





**Figura 18**– Dot-blot de 26 clones selecionados com anticorpos anti-TESA da biblioteca em  $\lambda$ ZAP com cDNA do *T. cruzi*. Os clones isolados foram: 1. 1; 2. 3; 3. 7; 4. 10; 5. 11; 6. 14; 7. 15; 8. 16; 9. 17; 10. 18; 11. 19; 12. 20; 13. 27; 14. 28; 15. 29; 16. 30; 17. 34; 18. 42; 19. 43; 20. 47; 21. 48; 22. 51; 23. 52; 24. 53; 25. 54; 26. 56. Painel **A** – Reatividade dos clones com anticorpos anti-TESA eluídos de soros de pacientes com infecção chagásica aguda e crônica. Painel **B** – Reatividade dos clones com anticorpos anti-TESA eluídos de soro com infecção chagásica aguda.

Após esta etapa de ciclos de reisolamentos realizados até atingir 100% de pureza, a reatividade dos clones foi confirmada por Dot-blot utilizando anticorpos anti-TESA imunoselecionados de soros de pacientes chagásicos.

De um total de 71 clones selecionados, 26 foram reconfirmados, por Dot-blot, com anticorpos anti-TESA imunoselecionados de soros chagásicos de fase aguda e crônica (Fig. 18A). Anticorpos anti-TESA purificado por afinidade de soro de fase aguda possibilitou a identificação do clone 47 (Fig. 18B).



**Figura 19** – Análise por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, dos clones isolados da biblioteca em  $\lambda$ ZAP com cDNA do *T. cruzi*. Os clones fágicos foram convertidos em fagemídeos pBK-CMV pelo processo de excisão *in vivo*. O DNA dos clones digeridos com *EcoRI* e *XhoI* e submetidos à eletroforese foram: 1. 1; 2. 18; 3. 28; 4. 54; 5. 3; 6. 51; 7. 53; 8. 16; 9. 34; 10. 56; 11. 7; 12. 10; 13. 11; 14. 17; 15. 29; 16. 30; 17. 27; 18. 43; 19. 47; 20. 19; 21. 20; 22. 15; 23. 42; 24. 14; 25. 48; 26. 52. Os padrões de tamanho molecular estão localizados nas extremidades esquerda e direita, em kilobases.

Similarmente aos clones selecionados pela sonda, os clones fágicos deste terceiro isolamento foram submetidos ao processo de excisão *in vivo* para a obtenção do inserto clonado no vetor fagemídeo pBKCMV (item 3.13).

A análise em gel de agarose a 1% das preparações de DNA dos clones fagemídeos, após digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* (Figura 19), mostraram fragmentos de insertos de diferentes tamanhos.

A maioria dos clones isolados apresentaram fragmentos de insertos com tamanhos entre 2,0-3,5 kb. O menor fragmento de inserto encontrado foi de aproximadamente 1,1 kb.

Para permitir uma maior discriminação do fragmento do inserto de cada clone, estes foram dispostos sequencialmente pela proximidade do seu tamanho molecular sem obedecer nenhuma ordem numérica. Os clones que confirmaram a presença do fragmento do inserto pela análise em gel de agarose foram sequenciados e comparados pelo *GenBank*.

Os resultados da análise comparativa da sequência de nucleotídeos obtida pelo *GenBank*, assim como o tamanho dos fragmentos dos insertos dos 26 clones analisados por eletroforese em gel de agarose (Fig. 19) podem ser observados na Tabela 2.

O sequenciamento parcial obtido destes 26 clones isolados podem ser encontrados nos anexos.

Embora parcialmente sequenciados, as sequências de nucleotídeos analisadas pelo *GenBank* permitiram a identificação de 14 clones (1, 7, 10, 11, 15, 17, 18, 27, 29, 30, 34, 43, 53 e 56) homólogos com os genes CEA, CRP e FL-160 que codificam proteínas de 160 kDa.

A sequência de nucleotídeos do clone 47 apresentou homologia com os genes TCTS/TCNA/SAPA que codificam as moléculas TS/SAPA do *T. cruzi*. Este foi o único clone reativo com anticorpos anti-TESA purificados de soros chagásicos de fase aguda, pela reação de Dot-blot (Fig. 18B)

A análise das sequências dos clones 3 e 16 mostraram homologia com os genes que codificam a proteína Hsp70 do *T. cruzi*. O clone 28 apresentou uma sequência homóloga à da desidrogenase do *T. cruzi*.

A análise das sequências de nucleotídeos de 8 destes clones (14, 19, 20, 42, 48, 51, 52 e 54) não tiveram nenhuma sequência identificada com a do *T. cruzi* ou outra sequência conhecida.

Pela análise em gel de agarose, alguns destes 26 clones mostraram fragmentos de insertos com tamanhos aparentemente semelhantes (Tabela 2). Após sequenciamento, os clones 18 e 27, com tamanhos aparentemente de 3,5 kb, mostraram homologia com o CEA. Porém, a análise da sequência de nucleotídeos do clone 18 também apresentou similaridade com a desidrogenase do *T. cruzi*.

Os clones 17, 34 e 53, com fragmentos de 2,4 kb, foram identificados com os genes CEA, CRP e FL-160. Todavia, estes clones apresentaram nítidas diferenças quando foram submetidos a uma análise comparativa das sequências de nucleotídeos (Fig. 20). Uma semelhança maior foi verificada entre as sequências de nucleotídeos dos clones 29 e 30, com tamanho molecular aparente de 3,3 kb.

**Tabela 2** - Tamanho do fragmento do inserto e homologia da sequência de nucleotídeos dos 26 clones selecionados com anticorpos anti-TESA da biblioteca de cDNA de *T. cruzi*, construída em  $\lambda$ ZAP.

Qtidade de clones	CLONES	Tamanho do inserto análise em gel (pbs)	Número de pbs sequenciados	Homologia das sequências de nucleotídeos ( <i>GenBank</i> )
1	1	1250	172	CEA
2	7	3100	666	CEA/CRP/FL-160-3
3	10	3000	473	CEA/FL-160-3/CRP
4	11	3300	743	CEA/CRP/FL-160-2
5	15	2000/700/300	513	CEA/FL-160-3/CRP
6	17	2400	720	CEA/FL-160-3/CRP
7	18	3500	709	CEA/desidrogenase
8	27	3500	276	CEA/FL-160mRNA
9	29	3300	262	CEA/FL-160-2/CRP
10	30	3300	278	CEA/CRP/FL-160-1
11	34	2400	320	CEA/CRP
12	43	1700	476	CEA/FL-160-1/CRP
13	53	2400	612	CEA/FL-160-2/CRP
14	56	2500	501	CEA/CRP/FL-160-3
15	47	1700	1471	TCTS/TCNA/SAPA
16	3	1900	188	Hsp70
17	16	3300/1700	564	Hsp70 mitocondrial
18	28	1100	818	Desidrogenase
19	14	1300	580	Sem homologia
20	19	1300	360	Sem homologia
21	20	3000/900	496	Sem homologia
22	42	600/300	460	Sem homologia
23	48	1300/1000	204	Sem homologia
24	51	2100	234	Sem homologia
25	52	2000/1200	234	Sem homologia
26	54	1200	633	Sem homologia

( ) número de acesso ao *GenBank*

Genes que codificam proteínas de 160 kDa:

(CEA) Chronic Exoantigen (M88337)

(CRP) Proteína Regulatória do Complemento (U59297)

(FL-160-1, FL-160-2, FL-160-3, FL-160mRNA

Antígeno Flagelar (M65032, X70948, X70949 e X70947).

Genes que codificam SAPA:

(TCTS-154) Trans-sialidase do *T. cruzi* (D50685)

(TCNA) Neuraminidase do *T. cruzi* (M61732)

(SAPA) Shed Acute Phase Antigen (X57235).

Genes hsp70 (X07083 e X13690) e hsp70 mitocondrial (M73627) do *T. cruzi*.

Gene da desidrogenase do *T. cruzi* (U31282).

#### 4.4.1 Características das sequências dos clones recombinantes obtidos no terceiro isolamento com potencial diagnóstico

A comparação das sequências de nucleotídeos dos insertos de 26 clones isolados da biblioteca de cDNA do *T. cruzi*, construída em  $\lambda$ ZAP, pelo *GenBank*, mostrou uma alta homologia de 15 deles, com genes pertencentes à Família Trans-sialidase do *T. cruzi*.

Desses 15 clones homólogos à Família Trans-sialidase, 14 deles (1, 7, 10, 11, 15, 17, 18, 27, 29, 30, 34, 43, 53 e 56) foram identificados com genes incluídos no Grupo III e apenas 1 (47) mostrou alta homologia com genes do Grupo I desta família.

Os 14 clones identificados com o Grupo III da Família Trans-sialidase apresentaram alta similaridade com os genes que codificam proteínas de 160 kDa do *T. cruzi*. Uma forte identidade destes clones foi constantemente observada com os genes CEA (M88337), CRP (U59297), FL-160-1 (M65032), FL-160-2 (X70948) e FL-160-3 (X70949), atingindo 87-97% de similaridade.

Dentre os genes que mostraram homologia com os 14 clones recombinantes selecionados, a sequência do CEA foi a que mais se identificou com estes isolados, por apresentar uma região amino-terminal pouco similar daquelas observadas nas sequências dos genes da CRP e FL-160.

Considerando-se a região sequenciada pelo primer 5' como o início de cada clone, podemos observar que estes 14 isolados homólogos ao Grupo III, apresentaram fragmentos que codificam diferentes regiões do gene CEA.

Uma análise comparativa (Figura 20) realizada entre as sequências de nucleotídeos desses 14 isolados mostrou que 11 destes clones (11, 30, 7, 29, 10, 56, 15, 34, 53, 17 e 43) foram similares entre si. Esta região compartilhada por esses 11 clones corresponde àquela compreendida entre 560-2112 pbs, de um total de 2993 pbs, do gene CEA. Pode ser observado que cada clone compartilha uma determinada região que se identifica com diferentes regiões do gene CEA (Fig. 20).

As sequências dos clones 1, 18 e 28 não apresentaram similaridade com os demais clones. A sequência de nucleotídeos do clone 1 apresentou homologia com a extremidade (2226-2397 pbs) carboxi-terminal do CEA. Por outro lado, a do clone 27 foi homóloga com a extremidade amino-terminal,

compreendida entre a região 255-530 pbs, dessa mesma molécula. Por último, a sequência de nucleotídeos do clone 18 mostrou uma região 5' similar com a desidrogenase do *T. cruzi* e na outra extremidade 3' apresentou uma identidade com a região (2937-2993 pbs) carboxi-terminal, que corresponde ao final da sequência do gene CEA.

Estes resultados demonstraram que estes 14 clones recombinantes apresentaram fragmentos gênicos que codificam diferentes regiões do gene CEA do *T. cruzi*. Mesmo que existam diferenças sobre o aspecto molecular desses clones, do ponto de vista antigênico, todos reagiram com anticorpos imunopurificados de pacientes chagásicos, demonstrando potencial capacidade para serem utilizados no diagnóstico da doença de Chagas.

A sequência de nucleotídeos do clone 47 foi a única a ser identificada com o gene da Trans-sialidase TCTS-154 (D50685) e TCTS-121 (D50684), da neuraminidase TCNA (M61732) e do SAPA (X57235) que fazem parte do Grupo I da Família Trans-sialidase do *T. cruzi*. A análise pelo GenBank da sequência de nucleotídeos do clone 47 mostrou uma homologia de 94-97% com estes genes.

O alinhamento múltiplo da sequência de nucleotídeos do clone 47 com as sequências das moléculas do Grupo I pode ser observado na Figura 21.

O domínio repetitivo destas moléculas do Grupo I, que é variável em números entre diferentes genes, no clone 47 é constituído de 7 unidades repetitivas de 12 aminoácidos, localizado na região compreendida entre D141-A224 (Fig. 21).

É interessante notar que a similaridade do clone 47 está mais relacionada com a região carboxi-terminal das demais moléculas homólogas. Isto pode representar maior potencial de antigenicidade deste clone, uma vez que as unidades repetitivas localizadas na extremidade carboxi-terminal destas moléculas, codificam epítomos capazes de conferir uma forte resposta humoral em pacientes chagásicos.

A utilização de anticorpos anti-TESA purificado de soro chagásico agudo, possibilitou a seleção do clone 47, que confirmou por Dot-blot ser altamente reativo com anticorpos de pacientes de fase aguda (Fig. 18B).

10 20 30 40 50 60 70  
 ATTAGGATGGAGGACAAAAGTCGCTATTTGCTGCCTATTCAAGCCTTGACCCGTGATGGAAAGAACGTTT  
 CLONE 11. SEQ (1>743) -> ATTAGGATGGAGGACAAAAGTCGCTATTTGCTGCCTATTCAAGCCTTGACCCGTGATGGAAAGAACGTTT  
 CLONE 30. SEQ (1>278) -> GCCTATTCAAGCCTTGAAAAATAATGGAAAGAACGTTT  
 CLONE 7. SEQ (1>666) -> CAAGCCTTGACCCGTGATGGAAAGAACGTTT  
 CLONE 29. SEQ (1>262) -> CGTTT

80 90 100 110 120 130 140  
 CTTTGGTCATCCTTGCCAACGGTACTTATTATGGTTGGGAGTTCTCGGAGGATACGAGTGTGATGAGGGATG  
 CLONE 11. SEQ (1>743) -> CTTTGGTCATCCTTGCCAACGGTACTTATTATGGTTGGGAGTTCTCGGAGGATACGAGTGTGATGAGGGATG  
 CLONE 30. SEQ (1>278) -> CTTTGGTCATCCTTGCCAACGGTTTTATTATGGTTGGGAGTTCTCGGAGGATACGAGTGTGATGAGGGATG  
 CLONE 7. SEQ (1>666) -> CTTTGGTCATCCTTGCCAACGGTACTTATTATGGTTGGGAGTTCTCGGAGGATACGAGTGTGATGAGGGATG  
 CLONE 29. SEQ (1>262) -> CTTTGGTCATCCTTGCCAACGGTACTTATTATGGTTGGGAGTTCTCGGAGGATACGAGTGTGATGAGGGATG

150 160 170 180 190 200 210  
 CATCCAGCCTGCGGTCCCTTGAATGGAATGATGAA-A--TTATCATGATGACGTCGTTGTGATGACGGCAG-  
 CLONE 11. SEQ (1>743) -> CATCCAGCCTGCGGTCCCTTGAATGGAATGATGAA-A--TTATCATGATGACGTCGTTGTGATGACGGCAG-  
 CLONE 30. SEQ (1>278) -> CATCCAGCCTGCGGTCCCTTGAATGGAAGGAAATGAGCTTATCATGATGACGTCGTTGTGATGACGGCAG-  
 CLONE 7. SEQ (1>666) -> CATCCAGCCTGCGGTCCCTTGAATGGAATGATGAA-A--TTATCATGATGACGTCGTTGTGATGACGGCAG-  
 CLONE 29. SEQ (1>262) -> CATCCAGCCTGCGGTCCCTTGAATGGAATGATGAAAGCTTATCATGATGACGTCGTTGTGATGACGGCAG-  
 CLONE 10. SEQ (1>473) -> GGAATGATGAA-A--TTATCATGATGACGTCGTTGTGATGACGGCAGT

220 230 240 250 260 270 280  
 CCGCAGGGTTTACTGGTCAAGCGCCATGGGGAGATGGTGGTACGAGGAATACGACACTCTTTCACGGCTG  
 CLONE 11. SEQ (1>743) -> CCGCAGGGTTTACTGGTCAAGCCATGGGGAGATGGTGGTACGAGGAATACGACACTCTTTCACGGCTG  
 CLONE 30. SEQ (1>278) -> CCGCAGGGTTTACTGGTCAAGCCATGGGGAGATGGTGGTACGAGGAATACGACACTCTTTCACGGCTG  
 CLONE 7. SEQ (1>666) -> CCGCAGGGTTTACTGGTCAAGCGCCATGGGGAGATGGTGGTACGAGGAATACGACACTCTTTCACGGCTG  
 CLONE 29. SEQ (1>262) -> CCGCAGGGTTTACTGGTCAAGCGCCATGGGGAGATGGTGGTACGAGGAATACGACACTCTTTCACGGCTG  
 CLONE 10. SEQ (1>473) -> CCGCAGGGTTTACTGGTCAAGCGCCATGGGGAGATGGTGGTACGAGGAATACGACACTCTTTCACGGCTG  
 CLONE 56. SEQ (1>501) -> GGT T TACTGGTCAAGCGCCATGGGGAAATGGTGGATGGAGGAATACGACACCTTTCACGGCTG

290 300 310 320 330 340 350  
 TGGGGCAACTCGCTGAATCGTACAGGGCACGGCGTGCAGGGTGGCTTCGTCAGCGCGATGATCGATGGGA  
 CLONE 11. SEQ (1>743) -> TGGGGCAACTCGCTGAATCGTACAGGGCACGGCGTGCAGGGTGGCTTCGTCAGCGCGATGATCGATGGGA  
 CLONE 30. SEQ (1>278) -> TGGGGCAACTCGCTGAATCGTACAGGGCACG  
 CLONE 7. SEQ (1>666) -> TGGGGCAACTCGCTGAATCGTACAGGGCACGGCGTGCAGGGTGGCTTCGTCAGCGCGATGATCGATGG-A  
 CLONE 29. SEQ (1>262) -> TGGGGCAACTCGCTGAATCGTACAGGGCACGGCGTGCAGGGTGGCTTC  
 CLONE 10. SEQ (1>473) -> TGGGGCAACTCGCTAATCCTACAAGGCACGGCGTGCAGGGTGGCTTCGTCAGCGCGATGATCGATGGGA  
 CLONE 56. SEQ (1>501) -> TGGGGCAACTCGCTGAATCGTACAGGGCACGGCGTGCAGGGTGGCTTCGTCAGCGCGATGATCGATGGGA  
 CLONE 15. SEQ (1>513) -> GGA

360 370 380 390 400 410 420  
 CAGAAATACATTCCCTCGTCAGTCGGCCGGTATATGCTGAGAAGAACGGTAAAGAAACGGGGCCGACTTCA  
 CLONE 11. SEQ (1>743) -> CAGAAATACATTCCCTCGTCAGTCGGCCGGTATATGCTGAGAAGAACGGTAAAGAAACGGGG-CGACTTCA  
 CLONE 7. SEQ (1>666) -> CAGAAATACA-TCCTCGTCAGTCGGCCGGTATATGCTGAGAAGAACGGTAAAGAAACGGGGCCGACTTCA  
 CLONE 10. SEQ (1>473) -> CAGAAATACATTCCCTCGTCAGTCGGCCGGTATATGCTGAGAAGAACGGTAAAGAAAC-GGGCCGACTTCA  
 CLONE 56. SEQ (1>501) -> CAGAAATACATTCCCTCGTCAGTCGGCCGGTATATGCTGAGAAGAACGGTAAAGAAACGGG-CGACATCC  
 CLONE 15. SEQ (1>513) -> CAGAAATACATTCCCTCGTCAGTCGGCCGGTATATACCAGAGAAGAACGGTAAAGAAAC-GGGCCGACTTCA

430 440 450 460 470 480 490  
 CYTGTGGCTGACGGACATGCAACGAATTTATGATGTTGGGCCGATATCCGCTGAGAATGAGAACGTCGCC  
 CLONE 11. SEQ (1>743) -> CCTGTGGCTGACGGACATGCAACGAATTTATGATGTTGGGCCGATATCCGCTGAGAATGAGAACGTCGCC  
 CLONE 7. SEQ (1>666) -> CCTGTGGCTGACGGACATGCAACGAATTTATGATGTTGGGCCGATATCCGCTGAGAATGAGAACGTCGCC  
 CLONE 10. SEQ (1>473) -> CCTGTGGCTGACGGACATGCAACGAATTTATGATGTTGGGCCGATATCCGCTGAGAATGAGAACGTCGCC  
 CLONE 56. SEQ (1>501) -> CTGTGTGGCCGACGGACATGCAACGAATTTATGATGTTGGGCCGATATCCGCTGAGAATGAGAACGTTGCC  
 CLONE 15. SEQ (1>513) -> CTGTGTGGCTGACGGACATGCAACGAATTTATGATGTTGGGCCGATATCCGCTGAGAATGAGAACGTCGCC  
 CLONE 34. seq (1>320) -> CGGACATGCAACGAATTTATGATGTTGGGCCGATATCCGCTGAGAATGAGAACGTCGCC  
 CLONE 53. SEQ (1>612) -> CGTCCG

500 510 520 530 540 550 560  
 GCCAGCACTCTGCTGTACGCCACGGTTCGAAGCGCAGTCATTGAAAAAGGAAGGACCGAAGGAAGAGAAGA  
 CLONE 11. SEQ (1>743) -> GCCAGCACTCTGCTGTACGCCACGGTTCGAAGCGCAGTCATTGAAAAAGGAAGGACCGAAGGAAGAGAAGA  
 CLONE 7. SEQ (1>666) -> GCCAGCACTCTGCTGTACGCCACGGTTCGAAGCGCAGTCATTGAAAAAGGAAGGACCGAAGGAAGAGAAGA  
 CLONE 10. SEQ (1>473) -> GCCAGCACTCTGCTGTACGCCACGGTTCGAAGCGCAGTCATTGAAAAAGGAAGGACCGAAGGAAGAGAAGA  
 CLONE 56. SEQ (1>501) -> GCCAGCACTCTGCTGTACGCCACGGTTCGAAGCGCAGTCATTGAAAAAGGAAGGACCGAAGGAAGAGAAGA  
 CLONE 15. SEQ (1>513) -> GCCAGCACTCTGCTGTACGCCACGGTTCGAAGCGCAGTCATTGAAAAAGGAAGGACCGAAGGAAGAGAAGA  
 CLONE 34. seq (1>320) -> GCCAGCACTCTGCTGTACGCCACGGTTCGAAGCGCAGTCATTGAAAAAGGAAGGACCGAAGGAAGAGAAGA  
 CLONE 53. SEQ (1>612) -> GCCAGCACTCTGCTGTACGCCACGGTTCGAAGCGCAGTCATTGAAAAAGGAAGGACCGAAGGAAGAGAAGA

570 580 590 600 610 620 630  
 AACTGTACTGCTCGTACGAGGTTGCTGCAGGGGARATAACTACAACATTACTTTTGTGGATCTGACGGGA  
 CLONE 11. SEQ (1>743) -> AACTGTACTGCTCGTACGAGGTTGCTGCAGGGGARATAACTACAACATTACTTTTGTGGATCTGACGGGA  
 CLONE 7. SEQ (1>666) -> AACTGTACTGCTCGTACGAGGTTGCTGCAGGGGARATAACTACAACATTACTTTTGTGGATCTGACGGGA  
 CLONE 10. SEQ (1>473) -> AACTGTACTGCTCGTACGAGGTTGCTGCAGGGGARATAACTACAACATTACTTTTGTGGATCTGACGGGA  
 CLONE 56. SEQ (1>501) -> AACTGTACTGCTCGTACGAGGTTGCTGCAGGGGARATAACTACAACATTACTTTTGTGGATCTGACGGGA  
 CLONE 15. SEQ (1>513) -> AACTGTACTGCTCGTACGAGGTTGCTGCAGGGGARATAACTACAACATTACTTTTGTGGATCTGACGGGA  
 CLONE 34. seq (1>320) -> AACTGTACTGCTCGTACGAGGTTGCTGCAGGGGARATAACTACAACATTACTTTTGTGGATCTGACGGGA  
 CLONE 53. SEQ (1>612) -> AACTGTACTGCTCGTACGAGGTTGCTGCAGGGGARATAACTACAACATTACTTTTGTGGATCTGACGGGA  
 CLONE 17. SEQ (1>720) -> GGTTCGTCAGGGGAGATAACTACAACATTACTTTTGTGGATCTGACGGGA

640 650 660 670 680 690 700  
 GAAGCTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAGGACCGGTACATTGCGAGGGGAACAC  
 CLONE 11. SEQ (1>743) -> GAAGCTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAGGACCGGTACATTGCGAGGGGAACAC  
 CLONE 7. SEQ (1>666) -> GAAGCTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAGGACCGGTACATTGCGAGGGGAACAC  
 CLONE 10. SEQ (1>473) -> GAAGCTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAGGACCGGTACATTGCGAGGGGAACAC  
 CLONE 56. SEQ (1>501) -> GAAGCTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAGGACCGGTACATTGCGAGGGGAACAC  
 CLONE 15. SEQ (1>513) -> GAAGCTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAGGACCGGTACATTGCGAGGGGAACAC  
 CLONE 34. seq (1>320) -> GAAGCTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAGGACCGGTACATTGCGAGGGGAACAC  
 CLONE 53. SEQ (1>612) -> GAAGCTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAGGACCGGTACATTGCGAGGGGAACAC  
 CLONE 17. SEQ (1>720) -> GAAGCTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAGGACCGGTACATTGCGAGGGGAACAC

710 720 730 740 750 760 770  
 GGCTGCGGGAATGAATGGRRGAATAATTGGCACMGTGACTGTGGTGAAGCCCTCACAAAGGGCTGTTTG  
 CLONE 11. SEQ (1>743) -> GGCTGCGGGAATGAATGGAGGAATAATTGGCACMGTGACTGTGGTGAAGCCCTCACAAAGGGCTGTTTG  
 CLONE 7. SEQ (1>666) -> GGCTGCGGGAAT  
 CLONE 56. SEQ (1>501) -> GGCTGCGGGAATGAATGG  
 CLONE 15. SEQ (1>513) -> GGCTGCGGGAATGAATGGGAGAAGTATGGCGCAGTACTGTGATGAAGCCCTCACAAAGGGCTGTTTG  
 CLONE 34. seq (1>320) -> GGCTGCGGGAATGAATGGGAGAATAATTGGCACMGTGACTGTGGTGAAGCC  
 CLONE 53. SEQ (1>612) -> GGCTGCGGGAATGAATGGGAGAATAATTGGTACAGTACTGTGGTGAAGCCCTCACAAAGGGACTGGTTG  
 CLONE 17. SEQ (1>720) -> GGCTGCGGGAATGAATGGAGGAATAATTGGCACMGTGACTGTGGTGAAGCCCTCACAAAGGGCTGTTTG

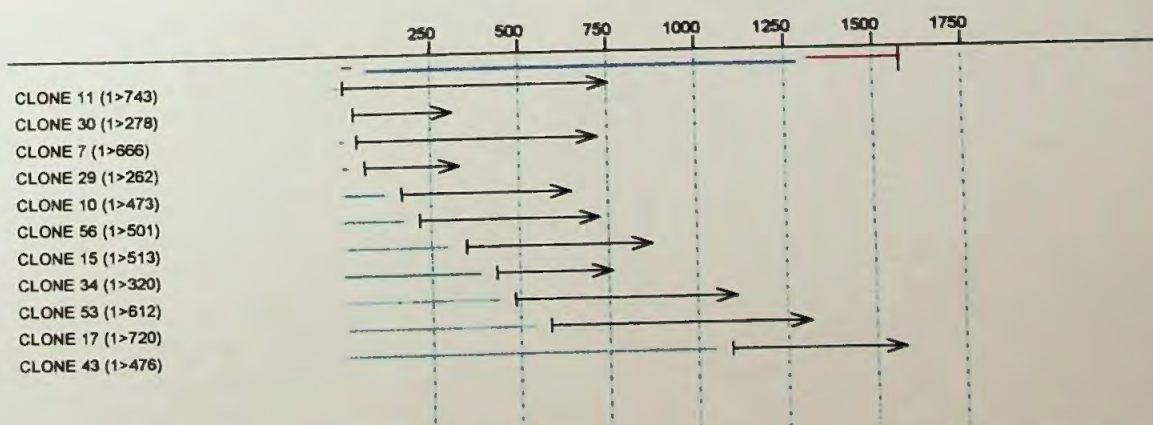
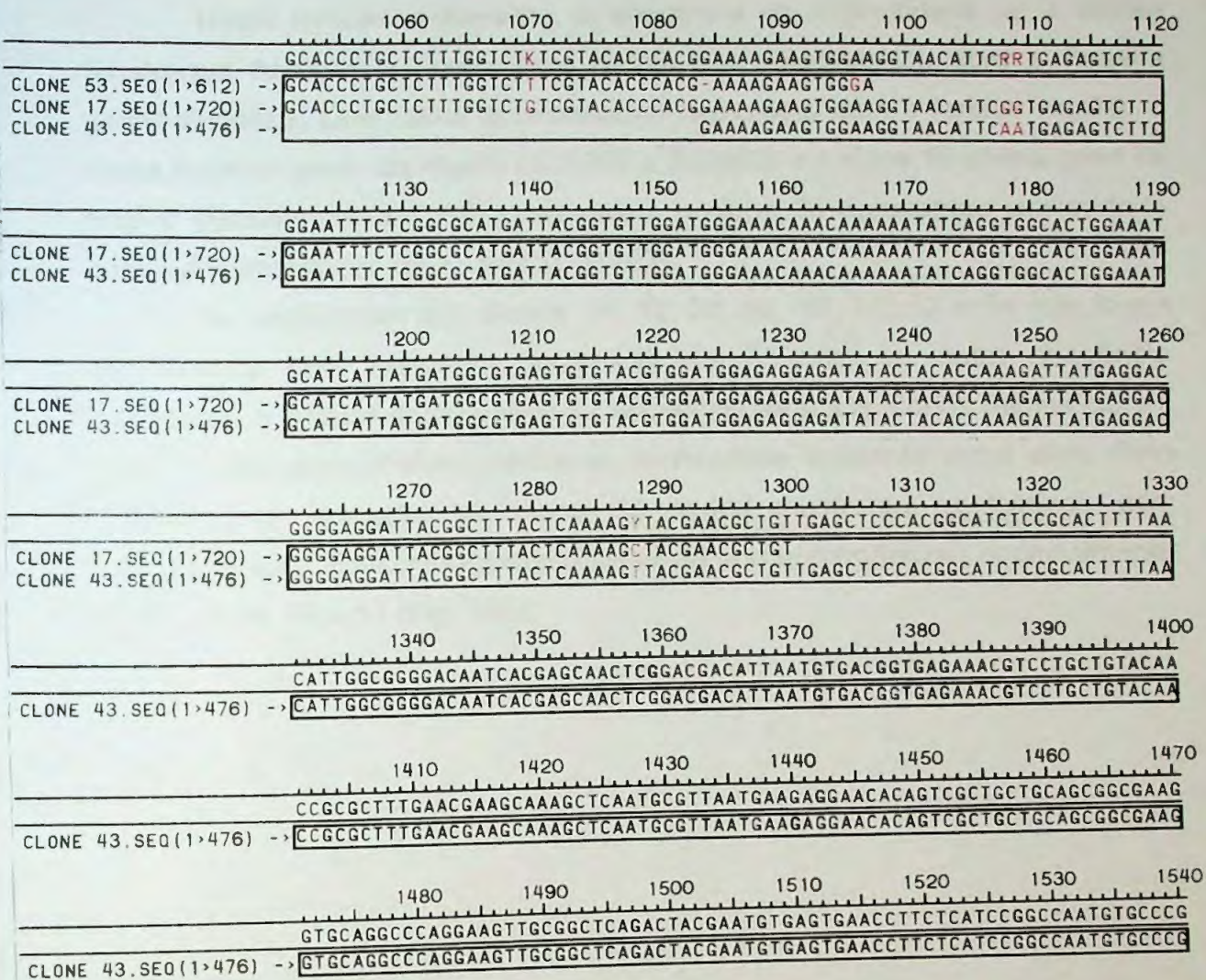
780 790 800 810 820 830 840  
 GCTTCTTATCCAACACGTCAACTGACAGCACGTGGGCAGACGAGTACCTCGGGGTGAATGCCACAGTGAA  
 CLONE 15. SEQ (1>513) -> GCTTCTTATCCAACACGTCAACTGACAGCACGTGGGCAGACGAGTACCTCGGGGTGAATGCCACAGTGAA  
 CLONE 53. SEQ (1>612) -> GATTCCTTATCCAACACGTCAACTGACAGCACGTGGGCAGACGAGTACCTCGGGGTGAATGCCACAGTGAA  
 CLONE 17. SEQ (1>720) -> GCTTCTTATCCAACAAGTCAACTGACAGCACGTGGGCAGACGAGTACCTCGGGGTGAATGCCACAGTGAA

850 860 870 880 890 900 910  
 CAAA-GGGAAGCCAGCGGGGATGGTGGATTGACKTTTCAAGGGTCCGGAGCAGGGGCGGAGTGGCCWGT  
 CLONE 15. SEQ (1>513) -> CAAA-GGGAAGCCAGCGGGGATGGTGGATTGACTTTCGAAGGGTCCGGAGCAGGGGCGGAGTGGCCAGT  
 CLONE 53. SEQ (1>612) -> CAAA-GGGAAGCCAGCGGGGATGGTGGATTGACTTTCGAAGGGTCCGGAGCAGGGGCGGAGTGGCCAGT  
 CLONE 17. SEQ (1>720) -> GAAA-GGGAAGCCAGCGGGGATGGTGGATTGACTTTCGAAGGGTCCGGAGCAGGGGCGGAGTGGCCGT

920 930 940 950 960 970 980  
 TGGCAAAATGGGGCAGAATGTGCCGTACTACTTTGCGAACKACAAGTTCACCTCTTGTGGCGACAGTGTC  
 CLONE 53. SEQ (1>612) -> TGGCAAAATGGGGCAGAATGTGCCGTACTACTTTGCGAACKACAAGTTCACCTCTTGTGGCGACAGTGTC  
 CLONE 17. SEQ (1>720) -> TGGCAAAATGGGGCAGAATGTGCCGTACTACTTTGCGAACKACAAGTTCACCTCTTGTGGCGACAGTGTC

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050  
 ATTCACAAGGAGCCGAAGGGAAGCAGCAGCTCTATCCCTTTGATGGGTGTGAGGATGAACGATGCACAAG  
 CLONE 53. SEQ (1>612) -> ATTCACAAGGAGCCGAAGGGAAGCAGCAGCTCTATCCCTTTGATGGGTGTGAGGATGAACGATGCACAAG  
 CLONE 17. SEQ (1>720) -> ATTCACAAGGAGCCGAAGGGAAGCAGCAGCTCTATCCCTTTGATGGGTGTGAGGATGAACGATGCACAAG





**Figura 20** – Similaridade entre os clones selecionados com anti-TESA que apresentaram homologia com moléculas (CEA, CRP e FL-160) codificadoras da proteína de 160 kDa do *T. cruzi*. A região compartilhada corresponde à (560-2112) pbs do gene CEA. — Região de compartilhamento

Neste terceiro isolamento, a sequência de nucleotídeos de 3 clones mostraram homologia com outros genes não relacionados com a Família Trans-sialidase. Dois deles apresentaram homologia com a família Hsp70, o clone 3 com o gene da Hsp70 (X07083 e X13690) e o clone 16 com o gene da Hsp70 mitocondrial (M73627). Um outro, o clone 28 apresentou similaridade com a desidrogenase de *T. cruzi* (U31282).

As sequências dos clones 14, 19, 20, 42, 48, 51, 52 e 54 não foram identificados com nenhuma sequência do *T. cruzi* ou outra sequência conhecida. A análise comparativa da sequência de nucleotídeos destes clones também não demonstraram nenhuma similaridade existente entre eles. Pelo Dot-blot, com exceção do clone 52, todos mostraram reatividade com anticorpos anti-TESA imunoselecionados de soros chagásicos, especialmente os clones 14, 42 e 51 (Fig. 18A)

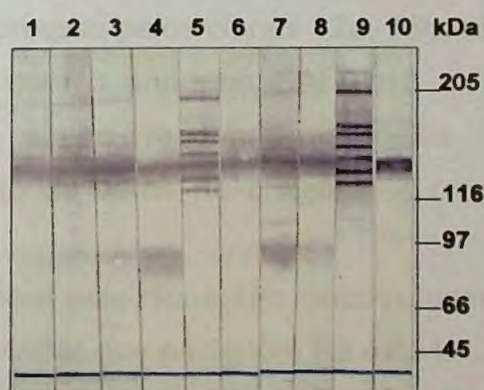
CLONE 47	ALLGASLDSSGGKLLGLSYDEKHQWQPI YGSTPVTPTGSWETGKRYHVVL TMANKI GSV	59
TCTS-154	PLLGASLDSSGGKLLGLSYDEKHQWQPI YGSTPVTPTGSWEMGKRYHVVL TMANKI GSV	589
TCNA	PLLGASLDSSGGKLLGLSYDEKHQWQPI YGSTPVTPTGSWETGKRYHLVL TMANKI GSV	672
SAPA	PLLGASLDSSGGKLLGLSYDEKHQWQPI YGSTPVTPTGSWETGKRYHVVL TMANRNGSV	638
CLONE 47	YI DGEPL EGSQGT VVPDERTPDI SHFYVGGYKRSDMPTI SHVTVNNVLLYNR- QLNAAEI	118
TCTS-154	YI DGEPL EGSQGT VVPDGRTPDI SHFYVGGYKRSDMPTI SHVTVNNVLLYNR- QLNAAEI	648
TCNA	YI DGEPL EGSQGT VVPDGRTPDI SHFYVGGYKRSDMPTI SHVTVNNVLLYNRRQLNTEEI	732
SAPA	YVDGELL KGSQGT VVPD- RTPDI SHFYVGGYKRSDMPTI SHVTVNNVLLYNR- QLNAAEI	697
CLONE 47	RTLFLSQDLI GTEAHMGSSS <b>DSSAHRTPSTPADARAHRTTPSTPADSSAHRTPSTPADSSA</b>	178
TCTS-154	RTLFLSQDLI GTEAHMGSSS <b>GSSAHRTPSTPADNGAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSA</b>	708
TCNA	RTLFLSQDLI GTEAHMDSSS <b>DSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSA</b>	792
SAPA	KTLFLSQDLI GTEAHMDSSS-----	717
CLONE 47	<b>HRTTPSTPADSSAHRTPSTPADNGAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSV</b> KYA----LNSL-	233
TCTS-154	HSTPSAPGDNGAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADNGAHRTPSAPADSNHRTPSTPADNGA	768
TCNA	HGTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSA	862
SAPA	-----	717
CLONE 47	. FLFPQYVFFS- R. QQCPQYALN- TR. HECLWYGDFARWRCI FALFGRRASFVCGCFAA	288
TCTS-154	H-----	769
TCNA	HGAPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSA	908
SAPA	-----DSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSA	765
CLONE 47	ARVRYGS--FLM. . ELLTNVDK- FIVL. TVWNVCSRSH- KEMISQ. CFFFVLELFEQ	340
TCTS-154	-----	769
TCNA	DSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSA	969
SAPA	DSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSA	826
CLONE 47	ICGQTVMSNLNLFVFLSL TLCLS- GDRVGM. GHCCCFVFLFFFLCFNLTIVCTLY	398
TCTS-154	-----STPSTPADNGAHRTP	784
TCNA	DSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSA	1025
SAPA	DSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSA	882
CLONE 47	-GDAFSLVT. GPTARQWHEGLLSR- RGI QRQRQL- TL CGAPREYF. S- - GRG- PIFDP	449
TCTS-154	STPGDNGAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADNGAHRTPSAPADSNHRTPSTPADNGAHRTP	845
TCNA	STPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTP	1086
SAPA	STPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTPSTPADSSAHRTP	935
CLONE 47	PGWGTR. VYPI RP- I VSRTIHWPSF. RVTG	477
TCTS-154	SAPADSNHRTPSTPADSSAHRTP	868
TCNA	STPADSSAHRTPSTPADSSAHRTP	1109
SAPA	-QM. I NHNCGVQLGKCVCA SHT	956

**Figura 21** – Análise comparativa da sequência deduzida de aminoácidos do clone 47 com as sequências homólogas dos genes TCTS-154 (D50685), TCNA (M61732) e SAPA (X57235) do Grupo I da Família Trans-sialidase. Os números de acesso dos genes ao *GenBank* se encontram entre parenteses. O domínio repetitivo do clone 47 se encontra assinalado.

#### 4.5 Reatividade imunológica dos clones recombinantes selecionados das bibliotecas de DNA e de cDNA do *T. cruzi* com anticorpos anti-TESA e com a sonda do TESA-1.

A reatividade dos 31 clones recombinantes isolados das bibliotecas de DNA genômico e de cDNA do *T. cruzi* foram analisadas por Dot-blot. Os anticorpos anti-TESA foram imunoselecionados de 8 soros de pacientes chagásicos: 1 de fase aguda (983) e 7 de fase crônica (CHC, 634, 635, 637, P7, P9 e P11).

O perfil de anticorpos reconhecidos pelo TESA-blot, presentes nestes soros chagásicos utilizados para purificar anti-TESA são mostrados na Figura 22. Os soros de pacientes chagásicos crônicos (Fig. 22, colunas 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 8) reconheceram predominantemente a banda de 150-160 kDa no TESA-blot, da cepa Y. Por outro lado, o soro de paciente com infecção chagásica aguda reagiu com o antígeno SAPA (Fig. 22, coluna 5) presente na fração TESA. Os soros hiperimunes de coelho anti-recombinante SAPA e anti-recombinante 160 (Fig. 22, colunas 9 e 10) foram usados como controle positivo.



**Figura 22** – Perfil pelo TESA-blot dos soros de pacientes chagásicos utilizados para purificação de anticorpos anti-TESA que foram empregados no Dot-blot dos clones recombinantes. 1. 634, 2. 635, 3. 637, 4. CHC, 5. 983, 6. P9, 7. P11, 8. P7, 9. anti-recombinante SAPA, 10. anti-recombinante 160.

Os anticorpos anti-TESA de 8 soros chagásicos foram purificados por afinidade ao TESA-blot e incubados individualmente com todos os clones, para a obtenção de uma reatividade sorológica específica.

Os resultados desta reatividade estão ilustrados na Figura 23 e se encontram detalhados na Tabela 3.

A proteína induzida pelo clone TESA-1, obtido no primeiro isolamento e identificado com a CRP e FL-160 do Grupo III da Família Trans-sialidase, reagiu com anticorpos anti-TESA imunoselecionados do soro dos pacientes P9, P7 e CHC. Estes dados vieram confirmar resultados previamente obtidos com a proteína recombinante TESA-1 expressa em pGEX.

Alguns dos soros (634, 635, 637 e P11) utilizados nesta análise foram selecionados por não apresentarem nenhuma reatividade com a proteína recombinante TESA-1. Por esta razão, os anticorpos anti-TESA purificados do paciente P11 foram incluídos para selecionar clones recombinantes no terceiro isolamento obtido da biblioteca de cDNA do *T. cruzi*.

Os dados observados mostraram uma grande quantidade de clones reativos com anticorpos anti-TESA eluídos do soro P11, comprovam a eficiência desta estratégia (Fig. 23).

Por outro lado, a proteína recombinante TESA-1 que foi reconhecida pelos soros de chagásicos de fase aguda (por Immunoblotting) não reagiu com os anticorpos imunoselecionados de soro de fase aguda.

As proteínas expressas pelos clones 12a, 15b, 16a e 25a, selecionados por sonda, homólogas com o antígeno CAI Tc13 do Grupo IV da Família Trans-sialidase, foram pouco reconhecidas pelos anticorpos anti-TESA imunoselecionados, tanto de soros de chagásicos crônicos como o de fase aguda.

A proteína expressa pelo clone 15b mostrou uma fraca reatividade com anticorpos imunoselecionados dos pacientes P9 e 634.

Dos 26 clones obtidos no terceiro isolamento, 14 deles (1, 7, 10, 11, 15, 17, 18, 27, 29, 30, 34, 43, 53 e 56) mostraram homologia com o Grupo III da Família Trans-sialidase. As proteínas induzidas por estes clones reagiram com anticorpos imunoselecionados de pacientes crônicos. Os clones 15, 43 e 53 não reagiram com anticorpos imunoselecionados dos pacientes crônicos 634, 635, P7 e P11.

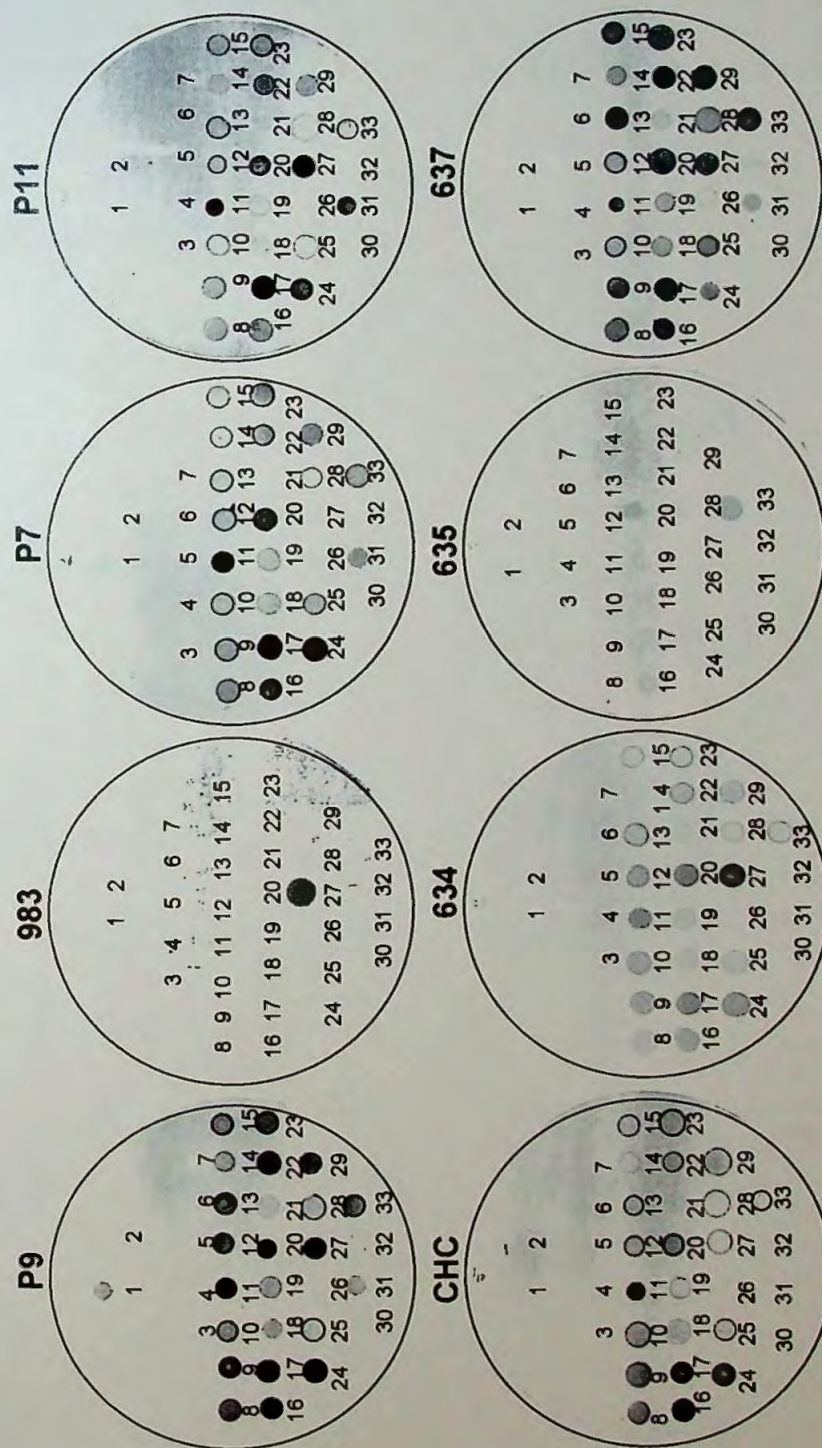
Nenhum destes 14 clones induziram proteínas recombinantes que fossem reconhecidas por anticorpos imunoselecionados de chagásico de fase

aguda, incluindo as dos clones 3 e 16 (homólogos com a Família da Hsp70), que reagiram somente com os anticorpos de fase crônica.

A proteína expressa pelo clone da desidrogenase de *T. cruzi* mostrou uma fraca reatividade com anticorpos imunoselecionados somente dos pacientes 634 e P9.

As proteínas recombinantes induzidas pelos clones 14, 20, 42, 48 e 51, que não apresentaram homologia com nenhum antígeno do *T. cruzi* já descrito, foram reconhecidos pelos anticorpos anti-TESA imunoselecionados de crônicos.

Somente a proteína induzida pelo clone 47 semelhante ao TS/SAPA reagiu com anticorpos anti-TESA imunoselecionados de soro agudo. Com exceção do paciente P7, todos os anticorpos anti-TESA imunoselecionados de soros crônicos, mostraram alta reatividade com a proteína do clone 47.



**Figura 23** - Reatividade dos clones recombinantes isolados das bibliotecas de DNA e de cDNA do *T. cruzi* por Dot-blot com anti-TESA purificados de 8 soros chagásicos (1 de fase aguda e 7 de fase crônica). Soros com infecção chagásica aguda: 983; soro chagásico crônico: P9, P7, P11, CHC, 634, 635 e 637. Clones obtidos na 1ª seleção: 1. TESA 1; 2. vetor  $\lambda$ gt11; 2ª seleção: 3. 8a; 4. 12b; 5. 15b; 6. 16b; 7. vetor  $\lambda$ ZAP; 3ª seleção: 8. 1; 9. 3; 10. 7; 11. 10; 12. 11; 13. 14; 14. 15; 15. 16; 16. 17; 17. 18; 18. 19; 19. 20; 20. 27; 21. 28; 22. 29; 23. 30; 24. 34; 25. 42; 26. 43; 27. 47; 28. 48; 29. 51; 30. 52; 31. 53; 32. 54 e 33. 56.

**Tabela 3** - Dot Blot dos clones isolados das bibliotecas de DNA genômico e de cDNA do *T. cruzi* com anticorpos anti-TESA purificados de 8 soros de pacientes (1 soro de fase aguda e 7 de fase crônica) da doença de Chagas.

Clones	Homologia	Reatividade com Ac anti-TESA Humano								
		Agudo	Crônicos							
		983	CHC	634	635	637	P7	P9	P11	
TESA-1	gp85/CRP/FL-160		+	Neg	Neg	Neg	Neg	+	++	Neg
12a	CAI Tc13		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
15b	CAI Tc13		Neg	+	Neg	Neg	Neg	Neg	+	Neg
16a	CAI Tc13		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
25a	CAI Tc13		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1	CEA		++	+	++	++	++	++	++	++
7	CEA/FL-160/CRP		++	++	+	++	++	++	++	++
10	CEA		+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
11	CEA/CRP		++	++	++	++	++	++	++	++
15	CEA/FL-160		+	Neg	Neg	+	+	+	+	+
17	CEA		+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	++
18	CEA/desidrogenase		+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
27	CEA/FL-160		++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++
28	Desidrogenase		Neg	+	Neg	Neg	Neg	+	+	Neg
29	CEA/FL-160		++	++	+	+++	+++	++	++	++
30	CEA/FL-160		++	++	+	+++	+++	++	++	++
34	CEA/CRP		+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
43	CEA		+	+	Neg	+	Neg	+	+	Neg
53	CEA/FL-160		+	+	Neg	+++	++	++	++	+++
56	CEA/CRP		++	++	+	+++	++	++	++	++
47	TCTS/TCNA/SAPA	+++	++	+++	+++	+++	Neg	+++	+++	+++
3	Hsp70		++	++	+	++	++	++	++	++
16	Hsp70		++	+	+	++	+	++	++	++
14	Sem homologia		++	++	+	++	++	++	++	++
19	Sem homologia		+	++	Neg	+	+	++	++	+
20	Sem homologia		+	++	+	+	+	++	++	++
42	Sem homologia		++	++	+	++	++	++	++	+
48	Sem homologia		++	++	+	++	++	+	+	+
51	Sem homologia		++	++	+	+++	++	++	++	++
52	Sem homologia		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
54	Sem homologia		+	+	Neg	+	Neg	+	+	Neg

(Neg) ⇒ Sorologia negativa

(+) ⇒ Sorologia positiva

(+++ , ++ , +) ⇒ Intensidade da reação



## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, o isolamento de genes que codificam proteínas excretadas-secretadas pelas formas tripomastigotas do *T. cruzi*, foi realizado, visando a obtenção de antígenos recombinantes específicos para atender às necessidades existentes no diagnóstico sorológico da doença de Chagas.

Como exposto no capítulo da introdução, esse estudo sobre proteínas excretadas e secretadas pelo *T. cruzi* (TESA), baseou-se principalmente nos dados previamente obtidos de dois polipeptídeos, revelados por TESA-blot. Um dos polipeptídeos, de 150-160 kDa, era altamente reativo com soros de pacientes chagásicos crônicos, enquanto que o outro, descrito como SAPA, era reconhecido preferencialmente por soros de pacientes de fase aguda.

Acresce-se ainda que outros estudos relatam que estas proteínas excretadas e secretadas do *T. cruzi* apresentando peso molecular de 160 kDa, são apontadas como alvo de anticorpos líticos, presentes somente naqueles pacientes portadores de infecção chagásica ativa.

Em vista da relevância destes antígenos, propusemo-nos a investigá-los mediante o isolamento e expressão de fragmentos gênicos. Para tanto, o desenvolvimento do trabalho foi efetuado em três etapas consecutivas.

Na primeira etapa, a seleção de clones recombinantes de uma biblioteca genômica de *T. cruzi*, construída em vetor de expressão  $\lambda$ gt11, foi realizada, com anticorpos anti-*T. cruzi* presentes em um "pool" de soros chagásicos purificados por afinidade da região de 110-180 kDa do TESA-blot, mediante eluição ácida (Fig. 1). A reatividade específica dos anticorpos eluídos de um "pool" de soros chagásicos crônicos foi confirmada pelo Immunoblotting, que mostrou uma forte reatividade da banda de 150-160 kDa da fração TESA (Fig. 1).

Esta forte reatividade da fração TESA (Fig. 11, coluna TESAA) contrastou com outra fraca, observada com o extrato de tripomastigota do *T. cruzi* (Fig. 11, coluna Tb). Estas observações confirmam resultados prévios mostrando que esses antígenos liberados de formas tripomastigotas se encontram transitoriamente localizados na superfície de membrana destes parasitas (Gonçalves et al., 1991). Por outro lado, nenhum dos polipeptídeos

presentes nos extratos de formas epimastigotas reagiram com anticorpos anti-TESA purificados por afinidade (Fig. 11, coluna 2).

O sequenciamento completo do inserto do TESA-1 (Fig. 6) comparado com os dados disponíveis no *GenBank* revelou sua alta homologia com moléculas pertencentes à Super Família Trans-sialidase do *T. cruzi*. Uma família representada por quase 1000 membros (Salazar et al., 1996) que compartilham a sequência VTVXNVXLYNR (Cross & Takle, 1993; Schenkman et al., 1994).

A sequência de nucleotídeos do TESA-1 mostrou que o fragmento que expressa essa proteína apresentou uma fase de leitura com 203 bps, codificando um peptídeo de 67 aminoácidos (Fig. 6). Todas as sequências de nucleotídeos que demonstraram similaridade com TESA-1 pelo *GenBank* (Fig. 7) foram de genes pertencentes ao Grupo III da Família Trans-sialidase do *T. cruzi*. Esta alta homologia do TESA-1 com moléculas pertencentes ao Grupo III foi confirmada pela sequência de nucleotídeos e pela sequência deduzida de aminoácidos. Dentre estas moléculas, TESA-1 mostrou 60-70% de identidade com a região carboxi-terminal das proteínas CRP-10 (U59297) e FL-160-1 (M65032), além de apresentar uma pequena região similar ao CEA (M88337). Por analogia, CEA apresenta 60% de similaridade com a região amino-terminal das proteínas FL-160 e CRP que pertencem à este mesmo grupo. Estes resultados indicam que TESA-1 está mais relacionado com as proteínas CRP e FL-160 do que com CEA.

TESA-1 também compartilha 87-90% de identidade com a região carboxi-terminal da gp85 (M91469) e gp85 (M91470), que também apresentam 59-72% de homologia com os genes FL-160 e CRP. Soro hiperímune produzido da proteína de fusão derivada deste gene reconheceu uma proteína de 160 kDa da superfície de tripomastigotas (Takle et al., 1992).

A subclonagem e expressão em pGEX-1 $\lambda$ T do fragmento do inserto de TESA-1 resultou no peptídeo de 38 kDa em fusão com GST do *Schistosoma japonicum* (Fig. 9A). Apesar de sua pequena constituição (203 bps), o peptídeo de apenas 10 kDa de TESA-1, exibiu forte reatividade com soro chagásico crônico por Immunoblotting (Fig. 9B), indicando que contém epítopos que são imunodominantes na infecção chagásica humana.

A reatividade do anti-recombinante TESA-1 com a banda de 150-160 kDa do TESA-blot mostra que epítomos imunogênicos do peptídeo TESA-1 estão presentes em mais de um determinante antigênico da fração nativa (Fig. 12, coluna 4). De maneira semelhante, a banda de 150-160 kDa presente no TESA-blot de 8 diferentes cepas e isolados de *T. cruzi* foi amplamente reconhecida pelo soro hiperimune anti-TESA-1 (Fig. 13A) e por um "pool" de soros chagásicos crônicos (Fig. 13B). Uma análise conjunta destes dados mostra que TESA-1 faz parte de um antígeno imunogênico que apresenta epítomos e tamanho conservados entre cepas de *T. cruzi*. A presença de epítomos entre diferentes cepas e isolados é uma característica indispensável a ser considerada, quando antígenos são aplicados no imunodiagnóstico da doença de Chagas (Cotrim et al., 1990).

Os epítomos que expressam o peptídeo TESA-1 mostraram-se antigênicos para a maioria dos pacientes chagásicos, atingindo 82,2% de sensibilidade por immunoblotting (Tabela 1). Apesar deste resultado ser inferior aos obtidos por outras proteínas recombinantes estudadas (Umezawa et al., 1999a), esta sensibilidade encontrada pode ser considerada alta, se considerarmos que TESA-1 representa somente um pequeno fragmento codificando parte do antígeno nativo de 150-160 kDa presente na fração TESA.

A avaliação por ELISA de outra proteína de 160 kDa derivada do antígeno flagelar FL-160 (Van Voorhis & Eisen, 1989) apresentou uma sensibilidade entre 36 a 66%, dependendo da origem da amostra do soro chagásico (Cetron et al., 1992).

A superior sensibilidade encontrada com o peptídeo TESA-1 (82,2%, Tabela 1) pode ser explicada pelos diferentes peptídeos analisados ou tipo do ensaio utilizado nas duas avaliações. Algumas tentativas de uso do TESA-1 em ELISA para avaliar soro chagásico e não chagásico mostraram resultados similares aos obtidos por Cetron et al. (1992) (dados não mostrados). Esta baixa sensibilidade do TESA-1 em ELISA resultou de uma fraca discriminação observada entre soro chagásico e não chagásico.

É provável que o peptídeo de 10 kDa expresso em fusão com GST, não foi adequadamente exposto em microplacas, após ser adsorvido ao suporte. Esta indisponibilidade de acesso ao sítio da proteína adsorvida no suporte também foi encontrada por alguns pesquisadores que utilizaram

proteínas em fusão com GST (Rabin et al., 1992; Murray et al., 1998 e König & Skerra, 1998). As dificuldades na utilização de ELISA com antígenos recombinantes ocorrem quando alguns epítomos são perdidos pela ligação da proteína diretamente ao suporte, impedindo que seu determinante antigênico tenha acesso ao anticorpo.

Uma alternativa para solucionar esse problema seria a clivagem do sítio específico da trombina, localizado adjacente ao inserto, para liberar o determinante antigênico em fusão com GST. Outra possibilidade seria a utilização do reagente GT-BSA (glutathiona-soro albumina bovina) imobilizado no suporte para capturar o antígeno recombinante por afinidade ao GST, deixando o determinante antigênico da proteína recombinante livre para se ligar ao anticorpo.

Na segunda etapa deste trabalho, os resultados mostrados pelo pequeno fragmento de 203 pbs, nos orientaram ao emprego estratégico do próprio inserto clonado do TESA-1, como uma sonda radioativa, para selecionar clones expressando outros epítomos presentes na banda de 150-160 kDa da fração TESA do *T. cruzi*.

A potencialidade da sonda do TESA-1, para selecionar antígenos da biblioteca de cDNA do *T. cruzi*, não forneceu os resultados esperados. Por outro lado, possibilitou a seleção de clones que se identificaram com moléculas incluídas no Grupo IV da Família Trans-sialidase do *T. cruzi*. As sequências de nucleotídeos de todos os clones selecionados com a sonda do TESA-1 foram identificados com o gene CAI Tc13 do Grupo IV desta Superfamília do *T. cruzi* (Fig. 16).

O estudo dos membros incluídos na Família Tc13 não estão ainda tão elucidados quanto aos de outros grupos que fazem parte da Super Família Trans-sialidase. Dados confirmados pela análise do sequenciamento parcial do gene CAI Tc13 mostra um grande domínio repetitivo constituído por 56 unidades (EPKSA) que podem diferir em um ou 2 aminoácidos, localizados anteriormente à região carboxi-terminal da molécula. Os nossos dados, também obtidos após análise do sequenciamento parcial dos nucleotídeos dos clones 12a, 15b, 16a e 25a, mostraram 86-91% de identidade com a região carboxi-terminal do gene CAI Tc13 (M92046).

Esta similaridade mostrada pelos clones selecionados por sonda indica que a sequência altamente conservada do TESA-1 funcionou, como um alvo seletivo deste gene, uma vez que diferentes fragmentos compartilham uma mesma região do gene CAI Tc13 (Fig. 16).

Foi interessante notar que a maioria das proteínas expressas por estes clones selecionados por sonda não exibiram excelente reatividade com anticorpos anti-TESA eluídos de pacientes chagásicos. Diferentemente da reatividade sorológica verificada com a proteína recombinante TESA-1, somente a proteína expressa pelo clone 15b demonstrou fraca reatividade com anticorpos anti-TESA eluídos de alguns dos soros de pacientes chagásicos testados. Nem mesmo a presença da sequência da sonda do TESA-1 (AF438316) identificada no clone 25a favoreceu a reatividade da proteína expressa. Esta reatividade singular foi observada na proteína expressa pelo clone 13, descrita por Ibañez et al., (1988) e, mais tarde denominada de CAI Tc13 (clone 13 da cepa CAI do *T. cruzi*). A proteína recombinante expressa pelo clone 13 demonstrou reatividade preferencial por uma proporção de soros de diferentes origens regionais, 41% do Brasil, 45% da Argentina e 11% do Chile. Posteriormente, uma mistura dos antígenos 1, 2, SAPA, 13 e 30 (DIA Kit™ Bio Chagas assay, Gador S.A.) foi avaliada com soros de pacientes chagásicos e não chagásicos, apresentando 99,1% de sensibilidade e 99,6% de especificidade (Pastini et al., 1994).

O epítipo do antígeno 13 foi encontrado associado à superfície de tripomastigotas pela IF realizada com parasitas vivos. Anticorpos imunoselecionados deste clone localizaram a presença do epítipo na banda de 85 kDa de tripomastigotas (Ibañez et al., 1988). Estes achados confirmam a fraca reatividade mostrada pelo antígeno 15b com anticorpos anti-TESA selecionados de proteínas excretadas e secretadas de tripomastigotas presentes em um "pool" de soros de pacientes chagásicos crônicos (dados não mostrados).

Outro fato importante relacionado ao gene CAI Tc13, identificado com os clones selecionados pela sonda do TESA 1, advém da sua similaridade com o recombinante TcD (M82834) descrito como uma unidade repetitiva constituída por 10 aminoácidos (Burns et al, 1992). De fato, a unidade repetitiva do gene TcD corresponde às 2 constituídas por 5 aminoácidos presentes no

domínio repetitivo do antígeno 13, que podem apresentar variações no último aminoácido (Campetella et al., 1992; Pastini et al., 1994). Apesar da semelhança observada no domínio repetitivo destes dois antígenos, o epítipo do TcD foi identificado na banda de 260 kDa predominantemente expressa em tripomastigotas e demonstrou uma superior sensibilidade de 95,6% com soros de pacientes chagásicos avaliados por ELISA. No entanto, é importante salientar que esses excelentes resultados foram obtidos pela avaliação de 15 resíduos do antígeno recombinante TcD, após mapeamento do epítipo imunodominante realizado com vários peptídeos sintéticos derivados da região repetitiva deste antígeno (Burns et al., 1992). Porém, Campetella et al. (1992) afirmaram que antisoros produzidos contra a região repetitiva do antígeno 13 são capazes de reconhecer proteínas que variam de 85-280kDa presentes nos extratos de tripomastigota. Estes dados, reforçam a semelhança existente entre CAI Tc 13 e TcD.

Embora a presença do domínio repetitivo não tenha sido encontrada na sequência de nucleotídeos parcialmente obtida dos clones aqui selecionados pela sonda do TESA-1, os peptídeos originados da região repetitiva do antígeno recombinante TcD vem demonstrando resultados muito promissores. Pois, a avaliação do peptídeo sintético TcD por ELISA realizada com soros de pacientes chagásicos e não chagásicos, apresentou uma sensibilidade de 93,8% e uma especificidade de 93%. Além disso, a mistura do TcD com o peptídeo PEP2 resultou em 99,4% de sensibilidade e 98% de especificidade (Peralta et al. 1994). Estes resultados mostram que os clones selecionados pela sonda de TESA-1 merecem ser posteriormente melhor investigados, porque juntamente com outros antígenos poderão fornecer uma importante contribuição no diagnóstico da doença de Chagas.

Na terceira etapa do presente trabalho, anticorpos anti-150-160 kDa presentes nos poucos soros chagásicos (17,8%) que não reagiram com TESA-1 foram considerados relevantes para selecionar clones recombinantes da biblioteca de cDNA do *T. cruzi*, construída em vetor de expressão  $\lambda$ ZAP. Anticorpos purificados do soro desses pacientes foram adicionados para fornecer uma seleção mais abrangente de epítopos do exo-antígeno de 150-160 kDa presentes na fração nativa do TESA.

Com base nestas considerações, utilizamos anticorpos anti-TESA purificados a partir de soros de pacientes crônicos e agudos da doença de Chagas, incluindo soros de pacientes chagásicos sorologicamente negativos para a proteína recombinante TESA-1 (Fig. 2). Estratégia esta que resultou na seleção de 26 clones recombinantes, que foram analisados pelas proteínas codificadas, bem como pelas sequências de nucleotídeos dos insertos.

A comparação desses clones obtidos no terceiro isolamento pelo GenBank permitiu a identificação de 15 deles com moléculas pertencentes à Família Trans-sialidase do *T. cruzi* (Tabela 2), a mesma pela qual o antígeno recombinante TESA-1 demonstrou homologia (Fig. 7).

Uma análise mais restrita à família identificaram 14 destes clones com as sequências de nucleotídeos de genes pertencentes ao Grupo III, conhecidos por codificar proteínas do *T. cruzi* com peso molecular de 160 kDa. Os clones 1, 7, 10, 11, 15, 17, 18, 27, 29, 30, 34, 43, 53 e 56 mostraram uma homologia de 81-96% com CEA (M88337), 85-96% com FL-160 (M65032, X70947, X70948, X70949 e X71867) e 83-93% com CRP-10 (U59297).

Os resultados indicam que os clones isolados, homólogos destas moléculas pertencentes ao Grupo III mostraram uma relação de identidade mais próxima da região amino-terminal do CEA do que das moléculas FL-160 e CRP. Para reforçar esta identidade com o CEA, 11 destes clones isolados apresentaram uma região de similaridade entre si, que corresponde àquela compreendida entre 560-2112 pbs da sequência deste gene, constituído por um total de 2993 pbs (Fig. 20).

Esta semelhança entre CEA e os clones que obtivemos pode estar relacionada com a abordagem empregada na seleção destas moléculas. Tanto CEA, como FL-160 e os antígenos deste presente trabalho foram obtidos a partir de bibliotecas de DNA do *T. cruzi*. As divergências existentes foram observadas em relação à origem de anticorpos utilizados para seleção dos clones. Os clones isolados neste trabalho e aquele do antígeno CEA foram selecionados com anticorpos anti-TESA originados de soros de pacientes chagásicos. Por outro lado, FL-160 foi selecionado de anticorpos de camundongos infectados, enquanto a CRP foi clonada por PCR, utilizando como alvo, uma sequência líder constituída por 39 nucleotídeos, (Van Voorhis & Eisen, 1989; Jazin et al., 1995; Norris et al., 1997).

Embora estas diferenças existam, tanto CEA como FL-160 e CRP, expressam proteínas de 160 kDa do *T. cruzi* que são reconhecidas por soros de pacientes chagásicos crônicos (Van Voorhis et al., 1991; Jazin et al., 1995; Norris et al., 1997). Por analogia, a reatividade dos antígenos recombinantes expressos pelos clones homólogos destas moléculas que codificam proteínas de 160 kDa, foi observada somente com anticorpos anti-TESA purificados de soros crônicos (Fig. 23, Tabela 3). Estes dados confirmam os resultados previamente obtidos por Umezawa et al. (1996b) e Nakazawa et al. (2001) que verificaram a reatividade destes soros na banda de 150-160 kDa da fração TESA.

A forte reatividade por Dot-blot destes clones homólogos às moléculas codificadoras de proteínas de 160 kDa com anticorpos anti-TESA eluídos de soros chagásicos crônicos assemelha-se com àquela observada com o antígeno nativo presente na fração TESA do *T. cruzi*. Os antígenos excretados-secretados provenientes do sobrenadante de culturas infectadas pelo *T. cruzi* submetidos ao SDS-PAGE não são corados com Coomassie blue R ou com nitrato de prata, mas reagem fortemente com os soros de pacientes chagásicos. Este fato demonstra que estes antígenos imunodominantes com soros de pacientes com infecção chagásica são capazes de estimular a produção de anticorpos de alta afinidade presentes nestes pacientes.

A reatividade do CEA foi observada, pela primeira vez, na banda de 160-170 kDa do sobrenadante de cultura de tripomastigotas com soro de pacientes de fase crônica da doença de Chagas. Esta reatividade foi constantemente observada durante o acompanhamento sorológico de 4 pacientes chagásicos resistentes ao benznidazole, por um período de 8 anos, e estava ausente em alguns indivíduos curados após tratamento quimioterápico (Jazin et al., 1991).

Outra proteína de 160 kDa localizada na superfície de tripomastigotas, denominada de CRP, foi reativa com anticorpos anti-*T. cruzi*, capazes de induzir à C3 convertase ao desencadeamento da lise mediada por complemento. A CRP apresenta alta afinidade aos componentes C3b e C4b do complemento humano, bloqueando a ativação em cascata do complemento e consequentemente prevenindo a lise de parasitas. Estes resultados foram comprovados *in vitro*, utilizando anticorpos purificados especificamente da



CRP, que demonstraram capacidade de induzir à lise mediada por complemento e a morte dos parasitas. A imunoreatividade da CRP com soros de pacientes foram correlacionados com os resultados do teste CML, demonstrando ser útil para indicar eficácia terapêutica e determinar ausência de parasitas circulantes (Nornis et al., 1994).

Também identificado com moléculas pertencentes à Família Trans-silidase do *T. cruzi* (Tabela II), o clone 47 foi o único dos 26 selecionados nessa etapa, que teve sua reatividade confirmada especificamente com anti-TESA purificado de soro de paciente com infecção chagásica aguda pelo Dot-blot (Fig. 18B). Posteriormente, a sequência de nucleotídeos do clone 47 mostrou alta similaridade com TCTS 154 (D50685), TCNA (M61732) e SAPA (X57235) pertencentes ao Grupo I da Família Trans-sialidase do *T. cruzi*.

A sequência de nucleotídeos do clone 47 mostrou ser 97% similar com TCTS 154, 95% com TCNA e 94% com SAPA. O alinhamento múltiplo da sequência deduzida de aminoácidos do clone 47 com as das proteínas homólogas, mostra uma região altamente conservada entre os 4 genes, localizada na porção carboxi-terminal da TCTS, TCNA e SAPA. O domínio repetitivo do clone 47 apresentando 7 unidades de 12 aminoácidos (Figura 21), também pode ser observada nesta região.

A constituição gênica das moléculas pertencentes ao Grupo I, similares à Trans-sialidase, são conhecidas por apresentar uma região amino terminal catalítica e uma carboxi-terminal formada por repetições de aminoácidos imunodominantes, capazes de induzir uma forte resposta humoral no paciente chagásico. Desta maneira, podemos afirmar que o clone 47, aqui obtido, expressa uma proteína potencialmente reativa, por apresentar essa região imunodominante codificada pelo domínio repetitivo, que é precocemente reconhecido por soros de pacientes chagásicos. Esta reatividade do clone 47 demonstrou ser alta, tanto com anticorpos anti-TESA eluídos de soro de paciente com infecção chagásica aguda como com aqueles purificados de soros de pacientes chagásicos crônicos. Somente o soro P7, que não reage com SAPA pelo TESA-blot, também não reconheceu a proteína recombinante expressa pelo clone 47, demonstrando a especificidade deste antígeno (Fig. 22, Tabela 3).

Além dos 15 clones pertencentes à Família Trans-sialidase do *T. cruzi*, outros 8 clones selecionados (14, 19, 20, 42, 48, 51, 52 e 54) não apresentaram homologia com sequências conhecidas do *T. cruzi* ou outra sequência qualquer disponível no GenBank. Identificações estas que merecem ser efetuadas, visto que 6 destes clones mostraram ser bastante reativos com anticorpos purificados de soros de pacientes chagásicos crônicos (Fig. 23, Tabela 3).

Entre os selecionados, também foram identificados outros três clones não relacionados com a Família Trans-sialidase do *T. cruzi*. Dois clones reativos com anticorpos anti-TESA eluídos de soros chagásicos crônicos mostraram alta homologia com a Família hsp70 do *T. cruzi*, conhecidas por serem altamente conservadas entre várias espécies de bactérias e parasitas. O clone 3 mostrou 99% de similaridade com o gene da hsp70 (X07083 e X13690) e o 16 mostrou ser 96% similar com a hsp70 mitocondrial (M73627). A capacidade demonstrada pelos clones 3 e 16 de expressar proteínas altamente reativas com anticorpos anti-TESA purificados de soros chagásicos foi surpreendente e merece ser melhor investigada.

Um outro clone que demonstrou ser pouco reativo, o clone 28, mostrou uma similaridade de 96% com o gene da desidrogenase do *T. cruzi* (U31282). Um fato interessante foi observado com o clone 18, por apresentar similaridade com a desidrogenase e CEA. A forte reatividade demonstrada por este clone com anticorpos anti-TESA purificados de soros crônicos indica que a presença do gene da desidrogenase não interferiu na reatividade da proteína expressa por este clone.

Atendendo às proposições deste trabalho, conseguimos obter uma grande quantidade de clones expressando antígenos que demonstraram reagir especificamente com anticorpos anti-TESA purificados de soros chagásicos. O clone TESA-1, o primeiro deles a ser aqui obtido, já foi produzido em *E. coli* e analisado com soros de pacientes chagásicos (Matsumoto et al., 2002 em anexos). Em prosseguimento às etapas desenvolvidas neste trabalho, os demais antígenos recombinantes poderão ser produzidos em grande escala e aplicados na padronização de novos testes, para preencher às necessidades urgentes que prevalecem na sorologia da doença de Chagas.

O avanço dos últimos anos tem demonstrado cada vez mais a validade dos antígenos recombinantes na sorologia da doença de Chagas (Almeida et al., 1990; Carvalho et al., 1993; Pastini et al., 1994; Krautz et al., 1998; Oelemann et al., 1999b; Saez-Alquezar et al., 2000; Vergara et al., 1991; Vergara et al., 1992; Peralta et al., 1994; Houghton et al., 1999; Umezawa & Franco da Silveira, 1999b; Houghton et al., 2000).

Entretanto, até o presente momento, ainda não dispomos de determinantes antigênicos capazes de discriminar as fases da doença de Chagas ou monitorar a cura de pacientes chagásicos submetidos ao tratamento quimioterápico específico.

Na área do imunodiagnóstico da doença de Chagas, várias são as possibilidades para a aplicação desses antígenos:

1. A mistura de antígenos expressos pelos clones homólogos à proteína de 160 kDa e pelo clone 47, homólogo a Trans-sialidase/SAPA, possibilitará um teste alternativo e altamente eficiente a ser utilizado na sorologia convencional da doença de Chagas.

2. O emprego individual do antígeno recombinante expresso pelo clone 47, homólogo a Trans-sialidase/SAPA, permitirá a detecção precoce de pacientes suspeitos de infecção aguda ou acompanhamento de casos de acidentes laboratoriais submetidos ao tratamento.

3. A utilização individual do antígeno expresso pelo clone 47 /e pelo clone homólogo à proteína de 160 kDa permitirá a discriminação de anticorpos encontrados nos soros de pacientes de fase aguda e crônica da doença de Chagas. Esta discriminação individual poderá possibilitar o diagnóstico diferencial da doença de Chagas, principalmente em pacientes suspeitos apresentando perfil de reconhecimento tanto da banda de 150-160 kDa como do antígeno SAPA, uma vez que a migração destas bandas se sobreposicionam no TESA-blot (cepa Y), dificultando a interpretação deste resultado.

4. O uso individual ou de um "pool" de proteínas recombinantes homólogas às moléculas de 160 kDa para monitorar a cura de pacientes chagásicos é outra possibilidade que merece ser investigada. Face a grande necessidade, a avaliação individual destas proteínas possibilitará a seleção de

um ou mais prováveis antígenos capazes de detectar anticorpos líticos no soro de pacientes chagásicos portadores de infecção ativa.

Posteriormente, existe ainda a possibilidade do diagnóstico da doença de Chagas ser bem sucedido, pela substituição de epítopos ou peptídeos sintéticos derivados desses antígenos.

## 6. CONCLUSÕES

1. A seleção de genes que codificam proteínas excretadas-secretadas pelo *T. cruzi* das bibliotecas de DNA e de cDNA do *T. cruzi* resultou na obtenção de um total de 31 clones recombinantes específicos do *T. cruzi*, assim identificados:
  - ⇒ 20 clones mostraram homologias com moléculas pertencentes à Família Trans-sialidase do *T. cruzi* apresentando as seguintes similaridades: 15 foram homólogos às moléculas codificadoras das proteínas de 160 kDa: CEA, CRP e FL-160, incluídas no Grupo III; 4 foram similares com genes que codificam antígenos Tc 13 pertencentes ao Grupo IV e somente 1 foi similar com o gene que codifica os antígenos da TCTS/TCNA/SAPA do Grupo I.
  - ⇒ 3 clones apresentaram homologias não relacionadas com a Família Trans-sialidase: 2 deles mostraram similaridades com a família Hsp 70 do *T. cruzi* e um deles com a desidrogenase do *T. cruzi*.
  - ⇒ 8 clones não apresentaram nenhuma similaridade com qualquer outra sequência conhecida do *T. cruzi*.
2. O fragmento de 203 pb do inserto do clone recombinante TESA-1, homólogo com proteínas do grupo III da Família Trans-sialidase do *T. cruzi*, expressou em pGEX um peptídeo de 10 kDa que reagiu especificamente com soros de pacientes de fase aguda e crônica da doença de Chagas.
3. Soro hiperimune anti-TESA-1 produzido em coelhos identificou o epítopo da proteína TESA-1 nos extratos de tripomastigota e amastigota do *T. cruzi* e na banda de 150-160 kDa da fração TESA de 8 diferentes cepas do *T. cruzi*.

4. A análise por Immunoblotting, da antigenicidade de TESA-1 com soros de pacientes chagásicos e não chagásicos, mostrou uma sensibilidade de 82,2% e uma especificidade de 93,3%.
  
  5. A reatividade por Dot-blot dos clones recombinantes isolados revelou:
    - ⇒ As proteínas expressas pelos clones recombinantes homólogos ao Grupo III que codificam proteínas de 160 kDa do *T. cruzi* foram reconhecidos somente por anticorpos anti-TESA purificados de soros de pacientes chagásicos crônicos.
  
    - ⇒ O antígeno expresso pelo clone recombinante 47, homólogo ao Grupo I que codifica TCTS/TCNA/SAPA reagiu com anticorpos anti-TESA purificados de soros de pacientes com infecção chagásica aguda e crônica, mas foi o único a ser reconhecido pelo soro de paciente com infecção chagásica aguda.
-

## 7. Resumo

O perfil de antigenicidade das proteínas excretadas-secretadas pelas formas tripomastigotas (TESA) do *T. cruzi* apresenta, por immunoblotting (TESA-blot), duas moléculas imunodominantes que permitem o diagnóstico diferencial da doença de Chagas. TESA-blot mostra uma banda de 150-160 kDa amplamente reconhecida por soros de pacientes de fase crônica e uma outra, denominada SAPA (shed acute phase antigen), preferencialmente reativa com soros da fase aguda da doença de Chagas (Umezawa et al., 1996b). Além disso, moléculas de 160 kDa presentes somente na infecção ativa, consideradas potentes candidatas como marcadores de cura da doença de Chagas, foram descritas como alvo de anticorpos líticos (Krautz et al., 2000). A relevância destes antígenos orientou-nos na seleção de genes que codificam TESA das bibliotecas de DNA e de cDNA do *T. cruzi*, através de anticorpos anti-TESA ou sonda, para finalidades diagnósticas.

Na primeira etapa, o clone recombinante TESA-1 foi selecionado de uma biblioteca genômica de *T. cruzi*, construída em  $\lambda$ gt11, com anticorpos anti-TESA purificados de um "pool" de soros chagásicos crônicos. O fragmento de 203 pbs do inserto de TESA-1 foi identificado com os genes CRP e FL-160 do Grupo III da Família Trans-sialidase que codificam proteínas de 160 kDa presentes na fração TESA do *T. cruzi*. TESA-1 expressou, em pGEX, um peptídeo solúvel de 10 kDa, especificamente reativo com soros de pacientes chagásicos. Soro hiperimune anti-TESA-1 demonstrou a presença do epítipo de TESA-1 nos antígenos tripomastigota e amastigota do *T. cruzi*, assim como reconheceu a banda de 150-160 kDa da fração TESA de 8 cepas do *T. cruzi*. Apesar de representar aproximadamente 8% dos genes CRP e FL-160 que codificam proteínas de 160 kDa, o epítipo de TESA-1 mostrou capacidade de reagir com 82,2% dos soros de pacientes chagásicos por Immunoblotting, com uma especificidade de 93,3%.

Na segunda etapa, o próprio inserto do clone TESA-1 utilizado como sonda selecionou os clones 8a, 12a, 15b e 16a da biblioteca de cDNA do *T. cruzi*, construída em  $\lambda$ ZAP. A alta homologia destes clones com o gene Tc 13 do Grupo IV da Família Trans-sialidase do *T. cruzi* indica que a

sequência de TESA-1 poderá ser usada como alvo para a identificação deste grupo de moléculas ainda pouco estudadas.

Na terceira etapa, anticorpos anti-TESA purificados de soros de pacientes das fases aguda e crônica da doença de Chagas selecionaram 26 clones da biblioteca de cDNA do *T. cruzi*, em  $\lambda$ ZAP. Desta seleção, 8 clones não mostraram identidade com qualquer sequência conhecida do *T. cruzi* e 15, foram identificados com genes da família Trans-sialidase (14 com os genes CEA, CRP e FL-160 de 160 kDa do Grupo III e 1 com o gene da TCNA/TCTS/SAPA do Grupo I). Além disso, foram identificados outros clones não relacionados com a Família Trans-sialidase: 2 com a Família Hsp 70 e 1 com a desidrogenase do *T. cruzi*.

As proteínas expressas pelos 31 clones recombinantes selecionados foram analisadas por Dot-blot com anticorpos anti-TESA purificados por afinidade de 8 soros de pacientes chagásicos (1 de fase aguda e 7 de fase crônica). Pelo Dot-blot, anticorpos anti-TESA purificados de soros chagásicos crônicos reconheceram somente proteínas expressas pelos clones recombinantes homólogos ao Grupo III. Somente o antígeno expresso pelo clone similar a TCNA/TCTS/SAPA reagiu com anticorpos anti-TESA purificados de soro chagásico agudo.

Os clones recombinantes selecionados resultaram no fornecimento de uma importante fonte de proteínas excretadas e secretadas, especificamente reativas com anticorpos de pacientes chagásicos, que poderão ser úteis para o imunodiagnóstico da doença de Chagas. A grande quantidade de clones homólogos às proteínas de 160 kDa do *T. cruzi* possibilita o emprego, tanto individual como em mistura, dessas proteínas recombinantes para discriminar as fases da doença de Chagas ou monitorar a cura de pacientes submetidos ao tratamento específico para esta doença. Além disso, a mistura de antígenos recombinantes homólogos às proteínas de 160 kDa do *T. cruzi* com aqueles homólogos à TCNA/TCTS/SAPA poderá fornecer um teste altamente sensível e eficaz para o sorodiagnóstico da doença de Chagas.



## 8. Abstract

Antigenicity profile of trypomastigote excreted-secreted antigens (TESA) of *T. cruzi* presents by immunoblotting (TESA-blot) two immunodominant molecules that permit the differential diagnostic of Chagas' disease. TESA-blot shows one 150-160 kDa band widely recognized by sera from chronic phase patients and another, called SAPA (shed acute phase antigen), preferentially reactive with sera from acute phase patients of Chagas' disease (Umezawa et al., 1996b). Furthermore, 160 kDa molecules only present in the active infection, considered potential candidate as cure markers of the Chagas' disease, were described as target of the lytic antibodies (Krautz et al., 2000). The relevance of these antigens orientated us to isolate genes that codify TESA by screening DNA and cDNA expression library of *T. cruzi* with anti-TESA antibodies and probe, for diagnostic purposes.

In the first step, the recombinant clone TESA-1 was isolated by screening a *T. cruzi* genomic library, constructed in  $\lambda$ gt11, with anti-TESA antibodies purified from a pool of chronic chagasic sera. The 203 bp fragment of TESA-1 insert was identified with CRP and FL-160 genes of Group III from the Trans-sialidase Family that codify 160 kDa proteins present in the *T. cruzi* TESA fraction. TESA-1 expressed in pGEX a 10 kDa soluble peptide, specifically reactive with sera from chagasic patients. Anti-TESA-1 hyperimmune serum demonstrated the presence of the TESA-1 epitope in the trypomastigote and amastigote antigens of *T. cruzi*, as well as recognized the 150-160 kDa band from the TESA fraction of eight *T. cruzi* strains. In spite of the TESA-1 epitope representing approximately 8% of CRP and FL-160 genes that codify 160 kDa proteins, it showed ability to react with 82,2% of the sera from chagasic patients by Immunoblotting, with a specificity of 93,3%.

In the second step, the insert of TESA-1 clone itself used as probe selected the clones 8a, 12a, 15b e 16a from the cDNA of *T. cruzi* library, constructed in  $\lambda$ ZAP. The high homology of these antigens with the Tc 13 gene of Group IV from the Trans-sialidase Family of *T. cruzi* indicates that TESA-1 sequence can be used as target for identification of these molecules group, still little studied.

In the third step, anti-TESA antibodies purified from sera of acute and chronic patients with Chagas' disease selected 26 clones of the *T. cruzi* cDNA library, constructed in  $\lambda$ ZAP. From this selection, 8 clones did not demonstrate identity with any known sequence of *T. cruzi* and 15 were identified with genes of the Trans-sialidase Family (14 with CEA, CRP and FL-160 genes of the Group III and 1 with TCNA/TCTS/SAPA gene of the Group I). Furthermore, other clones not related to Trans-sialidase Family were identified: 2 with the Hsp 70 Family and 1 with the *T. cruzi* dehydrogenase.

Proteins expressed by 31 selected recombinant clones were analysed by Dot-blot with affinity purified anti-TESA antibodies from eight chagasic patient sera (1 from acute phase and 7 from chronic phase). By Dot-blot, anti-TESA antibodies purified from chronic chagasic sera recognized only proteins expressed by recombinant clones homologous to Group III. Only the antigen expressed by clone similar to TCNA/TCTS/SAPA reacted with anti-TESA antibodies purified from acute chagasic sera.

The selected recombinant clones resulted in the supply of an important source of specific excreted-secreted proteins, specifically reactive with antibodies from chagasic patients that can be useful for the immunodiagnosis of Chagas' disease. The enormous quantity of clones homologous to 160 kDa proteins of *T. cruzi* make it possible the use of these recombinant proteins, individually as much as in mixture, to discriminate the phases of Chagas' disease or to monitor the cure of patients submitted to specific treatment for the disease. Furthermore, the mixture of recombinant antigens homologous to 160 kDa proteins of *T. cruzi* with those homologous to TCNA/TCTS/SAPA can provide a highly sensible and efficient test for the serodiagnosis of Chagas' disease.

## 8. Referências Bibliográficas

- ABATE, T., ROSENBERG, M., ALDAO, R.R., SLEZINGER, T.C. Cloning and partial characterization of a 28 kDa antigenic protein of *Trypanosoma cruzi*. **Biol. Res.**, Santiago, v.26, n.1/2, p.121-130, 1993.
- ABRAHAMSON, I.A., KATZIN, A.M., MILDER, R.V. A method for isolating *T. cruzi* amastigotes from spleen and liver using two-step discontinuous gradient centrifugation. **J. Parasitol.**, Lawrence, v.69, p.437-439, 1983.
- AFFRANCHINO, J.L., IBAÑEZ, C.F., LUQUETTI, A.O., RASSI, A., REYES, M.B., MACINA, R.A., ASLUND, L., PETTERSSON, U., FRASCH, A.C.C. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.34, p.221-228, 1989.
- ALMEIDA, E., KRIEGER, M.A., CARVALHO, M.R., OELEMANN, W., GOLDENBERG, S. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas disease and blood bank screening. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.85, n.4, p.513-517, 1990.
- ALMEIDA, I.C., KRAUTZ, G.M., KRETTLI, A.U., TRAVASSOS, L.R. Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*: a 74 kD antigen of trypomastigotes specifically reacts with lytic anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas disease. **J. Clin. Lab. Anal.**, New York, v.7, p.307-316, 1993.
- ALMEIDA, I.C., COVAS, D.T., SOUSSUMI, L.M.T., TRAVASSOS, L.R. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. **Transfusion**, Birmingham, v.37, p.850-857, 1997.

---

De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 2002.

- BURNS, J.M., SHREFFLER, W.G., ROSMAN, D.R., SLEATH, P.R., MARCH, C.J., REED, S.G. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.89, p.1239-1243, 1992.
- BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M.E., RASSI, A., eds. **Chagas disease (American trypanosomiasis): it's impact on transfusion and clinical medicine**. São Paulo: ISBT Brazil'92, 1992. p.13-30. (Obra baseada nos trabalhos apresentados ao 22º Congress of the International Society of Blood Transfusion, realizado em São Paulo, outubro 1992).
- CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v.8, n.5, p.227-234, 1966.
- CAMARGO, M.E., AMATO-NETO, V. Anti-*Trypanosoma cruzi* IgM antibodies as serological evidence of recent infection. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v.16, n.4, p.200-202, 1974.
- CAMARGO, M.E. An appraisal of Chagas disease serodiagnosis. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M.E., RASSI, A., eds. **Chagas disease (American trypanosomiasis): it's impact on transfusion and clinical medicine**. São Paulo: ISBT Brazil'92, 1992. p.165-178. (Obra baseada nos trabalhos apresentados ao 22º Congress of the International Society of Blood Transfusion, realizado em São Paulo, outubro 1992).
- CAMPETELLA, O., SANCHEZ, D., CASULO, J.J., FRASCH, A.C.C. A superfamily of *Trypanosoma cruzi* surface antigens. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v.8, n.11, p.378-381, 1992.
- CARVALHO, M.R., KRIEGER, M.A., ALMEIDA, E., OELEMANN, W., SHIKANAI-YASUDA, M.A., FERREIRA, A.W., PEREIRA, J.B., SAEZ-ALQUEZAR, A., DORTHIAC-LLACER, P.E., CHAMONE, D.F. Chagas'disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. **Transfusion**, Birmingham, v.33, p.830-834, 1993.

- CAZZULO, J.J., FRASCH, A.C.C. SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. **FASEB J.**, Bethesda, v.6, p.3259-3264, 1992.
- CERISOLA, J.A., CHABEN, M.F., LAZARI, J.O. Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Prensa Med Argent.**, Buenos Aires, v.49, p.1761-1767, 1962.
- CETRON, M.S., HOFF, R., KAHN, S., EISEN, H., VAN VOORHIS, W.C. Evaluation of recombinant trypomastigote surface antigen of *Trypanosoma cruzi* in screening sera from a population in rural Northeastern Brazil endemic for Chagas' disease. **Acta Trop.**, Amsterdam, v.50, p.259-266, 1992.
- CHILLER, T.M., SAMUDIO, M., ZOULEK, G. IGG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and Leishmania antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.43, n.6, p.650-656, 1990.
- CHUNG, C.T., MILLER, R.H. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.16, n.8, p.3580, 1988.
- COLLI, W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. **FASEB J.**, Bethesda, v.7, n.13, p.1257-1264, 1993.
- CORRAL, R.S., ORN, A., GRINSTEIN, S. Detection of soluble exoantigens of *Trypanosoma cruzi* by a dot-immunobinding assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.46, n.1, p.31-38, 1992.
- COTRIM, P.C., PARANHOS, G.P., MORTARA, R.A., WANDERLEY, J., RASSI, A., CAMARGO, M.E., FRANCO DA SILVEIRA, J. Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human sera. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.28, n.3, p.519-524, 1990.

- COUTINHO, C.M.C.M., CAVALCANTI, G.H., BONALDO, M.C., MORTENSEN, R.F., ARAÚJO-JORGE, T.C. *Trypanosoma cruzi*: detection of a surface antigen cross-reactive to human C-reactive protein. **Exp. Parasitol.**, Orlando, v.90, p.143-153, 1998.
- CROSS, G.A.M., TAKLE, G.B. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.47, p.385-411, 1993.
- DE TITTO, E.H., ARAÚJO, F.G. Mechanism of cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: importance of sialidase activity. **Acta Trop.**, Amsterdam, v.44, n.3, p.273-282, 1987.
- DIAS, J.C.P., SCHOFIELD, C.J. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n.1, p.103-121, 1999.
- ESTANI, S.S., SEGURA, E.L., RUIZ, A.M., VELAZQUEZ, E., PORCEL, V.M., YAMPOTIS, C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.59, n.4, p.526-529, 1998.
- FEINBERG, A.P., VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity activity. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.132, n.1, p.6-13, 1983.
- FISCHER, E., OUAISSI, M.A., VELGE, P., CORNETTE, J., KAZATCHKINE, M.D. gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. **Immunology**, Oxford, v.65, n.2, p.299-303, 1988.
- FRANCO DA SILVEIRA, J. *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens for serodiagnosis. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M.E., RASSI, A., eds. **Chagas disease (American trypanosomiasis): It's impact on transfusion and clinical medicine**. São Paulo: ISBT Brazil'92, 1992. p.207-218. (Obra baseada nos trabalhos apresentados ao 22º Congress of the International Society of Blood Transfusion, realizado em São Paulo, outubro 1992).

- FRANCO DA SILVEIRA, J., UMEZAWA, E.S., LUQUETTI, A.O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends Parasitol.**, Oxford, v.17, n.6, p.286-291, 2001.
- FRASCH, A.C.C., REYES, M.B. Diagnosis of Chagas disease using recombinant DNA technology. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v.6, n.4, p.137-139, 1990.
- FRASCH, A.C.C., CAZZULO, J.J., ASLUND, L., PETTERSSON, U. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v.7, n.6, p.148-151, 1991.
- FRASCH, A.C.C. Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. **Parasitology**, Cambridge, v.108, p.37-44, 1994.
- GAZZINELLI, R.T., GALVÃO, L.M.C., CARDOSO, J.E., CANÇADO, J.R., KRETTLI, A.U., BRENER, Z. Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-laminin antibodies in chagasic patients after specific treatment. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.26, n.9, p.1795-1800, 1988.
- GAZZINELLI, R.T., GALVÃO, L.M.C., KRAUTZ, G., LIMA, A.P.C.A., CANÇADO, J.R., SCHARFSTEIN, J., KRETTLI, A.U. Use of *T. cruzi* purified glycoprotein (GP57/51) or trypomastigote-shed antigens to assess cure for human Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.49, n.5, p.625-635, 1993.
- GILBERT, S.C., PLEBANSKI, M., GUPTA, S., MORRIS, J., COZ, M., AIDOO, M., KWIATKOWSKI, D., GREENWOOD, B.M., WHITTLE, H.C., HILL, A.V. Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism. **Science**, Washington, v.279, n.5354, p.1173-1177, 1998.
- GIORDANO, R., CHAMMAS, R., VEIGA, S.S., COLLI, W., ALVES, M.J.M. An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.65, p.85-94, 1994.

- GONÇALVES, M.F., UMEZAWA, E.S., KATZIN, A.M., DE SOUZA, W., ALVES, M.J.M., ZINGALES, B., COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Exp. Parasitol.**, Orlando, v.72, p.43-53, 1991.
- GRIJALVA, M.J., GOODRUM, K.J., ROWLAND, E.C. Immunological characterization of antigens released by *Trypanosoma cruzi*-infected cells. **J. Parasitol.**, Lawrence, v.85, n.4, p.663-671, 1999.
- GRUBER, A., ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. **Exp. Parasitol.**, Orlando, v.76, p.1-12, 1993.
- HOFT, D.F., KIM, K.S., OTSU, K., MOSER, D.R., YOST, W.J., BLUMIN, J.H., DONELSON, J.E., KIRCHHOFF, L.V. *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. **Infect. Immun.**, Washington, v.57, n.7, p.1959-67, 1989.
- HOSHINO-SHIMIZU, S., CAMARGO, M.E., NAGASSE, T.K. A stable polysaccharide-hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent *Trypanosoma cruzi* infections. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, São Paulo**, v.20, n.4, p.208-212, 1978.
- HOUGHTON, R.L., BENSON, D.R., REYNOLDS, L.D., MCNEILL, P.D., SLEATH, P.R., LODES, M.J., SKEIKY, Y.A.W., LEIBY, D.A., BADARO, R., REED, S.G. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.179, p.1226-1234, 1999.
- HOUGHTON, R.L., BENSON, D.R., REYNOLDS, L., MCNEILL, P., SLEATH, P., LODES, M., SKEIKY, Y.A.W., BADARO, R., KRETLI, A.U., REED, S.G. Multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas' disease. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.181, p.325-330, 2000.



- HUYNH, Q.K., VAALER, G.L., RECSEI, P.A., SNELL, E.E. Histidine decarboxylase of *Lactobacillus* 30aa: sequences of the cyanogen bromide peptide from the alpha chain. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.259, n.5, p.2826-2832, 1984.
- IBAÑEZ, C.F., AFFRANCHINO, J.L., FRASCH, A.C.C. Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v.25, p.175-184, 1987.
- IBAÑEZ, C.F., AFFRANCHINO, J.L., MACINA, R.A., REYES, M.B., LEGUIZAMON, S., CAMARGO, M.E., ASLUND, L., PETTERSSON, U., FRASCH, A.C.C. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v.30, p.27-34, 1988.
- JAZIN, E.E., LUQUETTI, A.O., RASSI, A., FRASCH, A.C.C. Shift of excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* during human Chagas' disease. *Infect. Immun.*, Washington, v.59, n.6, p.2189-2191, 1991.
- JAZIN, E.E., BONTEMPI, E.J., SANCHEZ, D.O., ASLUND, L., HENRIKSSON, J., FRASCH, A.C.C., PETTERSSON, U. *Trypanosoma cruzi* exoantigen is a member of a 160kDa gene family. *Parasitology*, Cambridge, v.110, p.61-69, 1995.
- JOINER, K.A., DIAS DA SILVA, W., RIMOLDI, M.T., HAMMER, C.H., SHER, A., KIPNIS, T.L. Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.263, n.23, p.11327-11335, 1988.
- KAHN, S.J., WLEKLINSKI, M. The surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* encode a superfamily of variant T cell epitopes. *J. Immunol.*, Washington, v.159, p.4444-4451, 1997.
- KAHN, S.J., NGUYEN, D.; NORSEN, J.; WLEKLINSKI, M.; GRANSTON, T.; KAHN, M. *Trypanosoma cruzi*: Monoclonal antibodies to the surface glycoprotein superfamily differentiate subsets of the 85-kDa surface glycoproteins and confirm simultaneous expression of variant 85-kDa surface glycoproteins. *Exp. Parasitol.*, Washington, v.92, p.48-56, 1999.

- KIPNIS, T.L., KRETTLI, A.U., DIAS DA SILVA, W. Transformation of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. **Scand. J. Immunol.**, Oxford, v.22, n.2, p.217-226, 1985.
- KONIG, T., SKERRA, A. Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.218, p.73-83, 1998.
- KRAUTZ, G.M., COUTINHO, M.G., GALVÃO, L.M.C., CANÇADO, J.R., KRETTLI, A.U. Antígenos solúveis liberados por tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* utilizados no teste de ELISA para detectar cura em pacientes chagásicos após tratamento específico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.27, n.4, p.199-207, 1994.
- KRAUTZ, G.M., GALVÃO, L.M.C., CANÇADO, J.R., GUEVARA-ESPINOSA, A., OUAISSI, A., KRETTLI, A.U. Use of a 24 kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas' disease. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, n.8, p.2086-2090, 1995.
- KRAUTZ, G.M., PETERSON, J.D., GODSEL, L.M., KRETTLI, A.U., ENGMAN, D.M. Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.58, n.2, p.137-143, 1998.
- KRAUTZ, G.M., KISSINGER, J.C., KRETTLI, A.U. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v.16, n.1, p.31-34, 2000.
- KRETTLI, A.U., BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **J. Immunol.**, Washington, v.128, n.5, p.2009-2012, 1982a.
- KRETTLI, A.U., CANÇADO, J.R., BRENER, Z. Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas' disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.76, n.3, p.334-340, 1982b.
- KRETTLI, A.U. Protective antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections: detection, functional activity and possible mechanisms of trypomastigote killing *in vivo* and *in vitro*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.79, p.59-65, 1984.

- KRETTLI, A.U. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* chronic infections in humans: usefulness of the complement regulatory protein antigens and lytic antibodies in the control of cure. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n.1, p.301-304, 1999.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680, 1970.
- LAFAILLE, J.J., LINS, J., KRIEGER, M.A., SOUTO-PADRON, T., DE SOUZA, W., GOLDEMBERG, S. Structure and expression of two genes encoding antigenic proteins bearing repetitive antigens. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.35, p. 127-136, 1989.
- LEGUIZAMÓN, M.S., CAMPETELLA, O.E., REYES, M.B., IBANEZ, C.F., BASOMBRIO, M.A., RINCON, J., ORN, A., FRASCH, A.C.C. Boodstream *Trypanosoma cruzi* parasites from mice simultaneously express antigens that are markers of acute and chronic human Chagas disease. **Parasitology**, Cambridge, v.102, p.379-385, 1991.
- LEGUIZAMÓN, M.S., CAMPETELLA, O.E., GONZALEZ-CAPPA, S.M., FRASCH, A.C.C. Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of *trans*-sialidase that inhibit its activity. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, n.8, p.3441-3446, 1994a.
- LEGUIZAMÓN, M.S., CAMPETELLA, O., RUSSOMANDO, G., ALMIRON, M., GUILLEN, I., GONZÁLEZ-CAPPA, S.M., FRASCH, A.C.C. Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase activity in sera from human infections. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.170, p.1570-1574, 1994b.
- LEGUIZAMÓN, M.S., MOCETTI, E., GARCIA RIVELLO, H., ARGIBAY, P., CAMPETELLA, O. *Trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system *in vivo*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.180, n.4, p.1398-1402, 1999.
- LESENECHAL, M., DURET, L., CANO, M.I., MORTARA, R.A., JOLIVET, M., CAMARGO, M.E., SILVEIRA, J.F., PARANHOS-BACCALA, G. Cloning and characterization of a gene encoding a novel antigen of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.87, n.2, p.193-204, 1997.

- LEVIN, M.J., MESRI, E., BENAROUS, R., LEVITUS, G., SCHIJMAN, A., LEVY-YEYATI, P., CHIALE, P.A., RUIZ, A.M., KAHN, A., ROSENBAUM, M.B, ET AL. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas heart disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.41, n.5, p. 530-538, 1989.
- LEVIN, M.J., FRANCO DA SILVEIRA, J., FRASCH, A.C.C., CAMARGO, M.E., LAFON, S., DEGRAVE, W.M., RANGEL-ALDAO, R. Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. **FEMS Microbiol. Immunol.**, Amsterdam, v.89, n.1, p.11-20, 1991.
- LEVY, A.M., BOAINAIN, E., KLOETZEL, J.K. In situ indirect fluorescent antibody: a new specific test to detect ongoing chagasic infections. **J. Clin. Lab. Anal.**, New York, v.10, n.2, p.98-103, 1996.
- LEW, A.M., BECK, D.J., THOMAS, L.M. Recombinant fusion proteins of protein A and protein G with glutathione S-transferase as reporter molecules. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.136, p.211-219, 1991.
- LORCA, M., VELOSO, C., MUNOZ, P., BAHAMONDE, M.I., GARCIA, A. Diagnostic value of detecting specific IgA and IgM with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens in congenital Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.52, n.6, p.512-515, 1995.
- LOW, H.P., SANTOS, M.A.M., WIZEL, B., TARLETON, R.L. Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8<sup>+</sup> CTL<sup>1</sup>. **J. Immunol.**, Washington, v.160, p.1817-1823, 1998.
- LUQUETTI, A.O. Etiological treatment for Chagas disease. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v.13, n.4, p.127-130, 1997.
- MARTINS, M.S., HUDSON, L., KRETLI, A.U., CANÇADO, J.R., BRENER, Z. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.61, p.343-350, 1985.

- MATSUMOTO, T.K., HOSHINO-SHIMIZU, S., NAKAMURA, P.M., ANDRADE Jr., H.F., UMEZAWA, E.S. High resolution of *Trypanosoma cruzi* amastigote antigen in serodignosis of different clinical forms of Chagas' disease. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.31, n.6, p.1486-1492, 1993.
- MILLAR, A.E., WLEKLINSKI-LEE, M., KAHN, S.J. The surface protein superfamily of *Trypanosoma cruzi* stimulates a polarized Th1 response that becomes anergic. **J. Immunol.**, Washington, v.162, p.6092-6099, 1999.
- MILLAR, A.E., KAHN, S.J. The SA85-1.1 protein of the *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase superfamily is a dominant T-cell antigen. **Infect. Immun.**, Washington, v.68, n.6, p.3574-3580, 2000.
- MONCAYO, A., LUQUETTI, A.O. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.85, n.4, p.489-495, 1990.
- MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n.1, p.401-404, 1999.
- MULLER, L.A., AÑASCO, N., GONZÁLEZ-CAPPA, S.M. *Trypanosoma cruzi*: isolate dependence in the induction of lytic antibodies in the mouse and rabbit. **Exp. Parasitol.**, Orlando, v.61, p.284-293, 1986.
- MURRAY, A.M., KELLY, C.D., NUSSEY, S.S., JOHNSTONE, A.P. Production of glutathione-coated microtitre plates for capturing recombinant glutathione S-transferase fusion proteins as antigens in immunoassays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.218, n.1/2, p.133-139, 1998.
- MURTA, A.C.M., PERSECHINI, P.M., DE SOUTO PADRON, T., DE SOUZA, W., GUIMARAES, J., SCHARFSTEIN, J. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.43, p.27-46, 1990.
-

- NAKAZAWA, M., ROSA, D.S., PEREIRA, V.R.A., MOURA, M.O., FURTADO, V.C., SOUZA, W.V., BARROS, M.N.D.S., ABATH, F.G.C., GOMES, Y.M. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v.8, n.5, p.1024-1027, 2001.
- NORRIS, K.A., HARTH, G., SO, M. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. **Infect. Immun.**, Washington, v.57, n.8, p.2372-2377, 1989.
- NORRIS, K.A., BRADT, B., COOPER, N.R., SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. **J. Immunol.**, Washington, v.147, n.7, p.2240-2247, 1991.
- NORRIS, K.A., SCHRIMP, J.E. Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, n.1, p.236-243, 1994.
- NORRIS, K.A., GALVÃO, M.C., SCHRIMP, J.E., CANÇADO, J.R., KRETLI, A.U. Humoral immune response to the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitologic clearance in human Chagas' disease. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, n.9, p.4072-4074, 1994.
- NORRIS, K.A., SCHRIMP, J.E., SZABO, M.J. Identification of the gene family encoding the 160-kilodalton *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. **Infect. Immun.**, Washington, v.65, n.2, p.349-357, 1997.
- NORRIS, K.A. Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. **Infect. Immun.**, Washington, v.66, n.6, p.2460-2465, 1998.
- OELEMANN, W.M.R., TEIXEIRA, M.G.M., PERALTA, J.M. Screening and confirmation in Chagas disease serology: a contribution. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n.1, p.307-308, 1999a.

- OELEMANN, W.M.R., VANDERBORGHT, B.O.M., VERISSIMO DA COSTA, G.C., TEIXEIRA, M.G.M., BORGES-PEREIRA, J., DE CASTRO, J.A.F., COURA, J.R., STOOPS, E., HULSTAERT, F., ZREIN, M., PERALTA, J.M. A recombinant and peptide antigen line immunoassay optimized for confirmation of Chagas disease. *Transfusion*, Birmingham, v.39, p.711-717, 1999b.
- OSAKI, L.S., MATTEI, D., JENDOUBI, M., DRUIBLE, P., BLISNICK, T., GUILLOTTE, M., PUIJALON, O., DA SILVA, L.P. Plaque antibody selection: rapid immunological analysis of a large number of recombinant phage clones positives to sera raised against *Plasmodium falciparum* antigens. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.89, n.2, p.213-219, 1986.
- OUAISSI, M.A., CORNETTE, J., CAPRON, A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v.19, p.201-211, 1986.
- OUAISSI, M.A., TAIBI, A., CORNETTE, J., VELGE, P., MARTY, B., LOYENS, M., ESTEVA, M., RIZVI, F.S., CAPRON, A. Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitology*, Cambridge, v.100, p.115-124, 1990.
- OUAISSI, M.A., TAIBI, A., LOYENS, M., MARTIN, U., AFCHAIN, D., MAIDANA, C., CAUDIOTI, C., CORNETTE, J., MARTELLEUR, A., VELGE, P., MARTY, B., CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi*: a carbohydrate epitope defined by a monoclonal antibody as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.45, n.2, p.214-225, 1991.
- PASTINI, A.C., IGLESIAS, S.R., CARRICARTE, V.C., GUERIN, M.E., SANCHEZ, D.O., FRASCH, A.C.C. Immunoassay with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens potentially useful for screening donated blood and diagnosing Chagas' disease. *Clin. Chem.*, Washington, v.40, n.10, p.1893-1897, 1994.

- PERALTA, J.M., TEIXEIRA, M.G.M., SHREFFLER, W.G., PEREIRA, J.B., BURNS, J.M., SLEATH Jr., P.R., REED, S.G. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, p.971-974, 1994.
- PEREIRA, M.E.A. A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. **Science**, Washington, v.219, p.1444-1446, 1983.
- PEREIRA, V.L., LEVY, A.M., BOAINAIN, E. Xenodiagnóstico, hemocultura e lise mediada por complemento como critérios de seleção de pacientes chagásicos crônicos para quimioterapia. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v.31, n.5, p.301-307, 1989.
- POLLEVICK, G.D., AFFRANCHINO, J.L., FRASCH, A.C.C., SANCHEZ, D.O. The complete sequence of a shed-acute phase-antigen of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.47, p.247-250, 1991.
- PREVIATO, J.O., ANDRADE, A.F.B., PESSOLANI, M.C.V., MENDONÇA-PREVIATO, L. Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules: a proposal for a new metabolic route. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.16, p.85-96, 1985.
- PRIMAVERA, K.S.C., HOSHINO-SHIMIZU, S., UMEZAWA, E.S., PERES, B.A., MANIGOT, D.A., CAMARGO, M.E. Immunoglobulin A antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in digestive forms of Chagas' disease. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.26, n.10, p.2101-2104, 1988.
- RABELLO, A., LUQUETTI, A.O., MOREIRA, E.F., GADELHA, M.F., DOS SANTOS, J.A., DE MELLO, L., SCHWIND, P. Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection using the new particle gel immunoassay ID PaGIA Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n.1, p.77-82, 1999.
- RABIN, D.U., PALMER-CROCKER, R., MIERZ, D.V., YEUNG, K.K. An ELISA sandwich capture assay for recombinant fusion proteins containing glutathione-S-transferase. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.156, p.101-105, 1992.



- RASSI, A., LUQUETTI, A. Therapy of Chagas disease. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M.E., RASSI, A., eds. **Chagas disease (American trypanosomiasis):** It's impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo: ISBT Brazil'92, 1992. p.237-248. (Obra baseada nos trabalhos apresentados ao 22º Congress of the International Society of Blood Transfusion, realizado em São Paulo, outubro 1992).
- REYES, M.A., LORCA, M., MUÑOZ, P., FRASCH, A.C.C. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.87, p.2846-2850, 1990.
- RIMOLDI, M.T., SHER, A., HEINY, S., LITUCHY, A., HAMMER, C.H., JOINER, K. Developmentally regulated expression by *Trypanosoma cruzi* of molecules that accelerate the decay of complement C3 convertases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.85, p.193-197, 1988.
- SAEZ-ALQUÉZAR, A., SABINO, E.C., SALLES, N., CHAMONE, D.F., HULSTAERT, F., POTTEL, H., STOOPS, E., ZREIN, M. Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA Chagas. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.2, p.851-854, 2000.
- SALAZAR, N.A., MONDRAGON, A., KELLY, J.M. Mucin-like glycoprotein genes are closely linked to members of the trans-sialidase super-family at multiple sites in the *Trypanosoma cruzi* genome. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.78, p.127-136, 1996.
- SALLES, N.A., SABINO, E.C., CLIQUET, M.G., ELUF-NETO, J., MAYER, A., ALMEIDA-NETO, C., MENDONÇA, M.C., DORLIACH-LLACER, P., CHAMONE, D.F., SAEZ-ALQUEZAR, A. A risk exposure for Chagas' disease among seroreactive Brazilian blood donors. **Transfusion**, Birmingham, v.36, p.969-973, 1996.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. apêndice B-22, p.1.74-1.84.

- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.
- SANTANA, J.M., GRELLIER, P., SCHRÉVEL, J., TEIXEIRA, A.R.L. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **Biochem. J.**, London, v.324, p.129-137, 1997.
- SCHARFSTEIN, J., LUQUETTI, A.O., MURTA, A.C.M., SENNA, M., REZENDE, J.M., RASSI, A., MENDONÇA-PREVIATO, L. Chagas'disease serodiagnosis with purified Gp25 antigen. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.34, n.6, p.1153-60, 1985.
- SCHATTSCHEIDER, W., LOPES, E.R., ALENCAR, J.E., BIENZLE, U., FELDMEIER, H.A. Comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas' disease in Brazilian patients. **Trop. Geogr. Med.**, Amsterdam, v.44, p.210-218, 1992.
- SCHECHTER, M., LUQUETTI, A.O., REZENDE, J.M., RASSI, A., MILES, M.A. Further evaluation of lectin affinity purified glycoprotein (GP90) in the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.79, p.637-640, 1985.
- SCHECHTER, M., STEVENS, A.F., LUQUETTI, A.O., SNARY, D., ALLEN, A.K., MILES, M.A. Prevalence of antibodies to 72 kilodalton glycoprotein (GP72) in patients with Chagas' disease and further evidence for zymodeme associated expression of GP72 carbohydrate epitopes. **Infect. Immun.**, Washington, v.53, p.547-552, 1986.
- SCHENKMAN, S., PONTES DE CARVALHO, L., NUSSENZWEIG, V. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. **J. Exp. Med.**, New York, v.175, p.567-575, 1992.

- SCHENKMAN, S., EICHINGER, D. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v.9, n.6, p.218-222, 1993.
- SCHENKMAN, S., EICHINGER, D., PEREIRA, M.E.A., NUSSENZWEIG, V. Structural and functional properties of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.48, p.499-523, 1994.
- SCHMUÑIS, G.A., SZARFMAN, A., LANGEMBACH, T., DE SOUZA, W. Induction of capping in blood-stage trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* by human anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies. **Infect. Immun.**, Washington, v.20, n.2, p.567-569, 1978.
- SCHMUÑIS, G.A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and non-endemic countries. **Transfusion**, Birmingham, v.31, n.6, p.547-557, 1991.
- SILVA, L.H.P., NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo albino. **Folia Clin. Biol.**, São Paulo, v.20, p.191-207, 1953.
- SMITH, D.B., JOHNSON, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *E. coli* as fusions with glutathione S-transferase. **Gene**, Amsterdam, v.67, n.1, p.31-40, 1988.
- SOLANA, M.E., KATZIN, A.M. UMEZAWA, E.S., SOSA-MIATELLO, C. High specificity of *Trypanosoma cruzi* epimastigote ribonucleoprotein as antigen in serodiagnosis of Chagas' disease. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, n.6, p.1456-1460, 1995.
- TAMBOURGI, D.V., KIPNIS, T.L., SILVA, W.D., JOINER, K.A., SHER, A., HEATH, S., HALL, B.F., OGDEN, G.B. A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. **Infect. Immun.**, Washington, v.61, n.9, p.3656-3663, 1993.

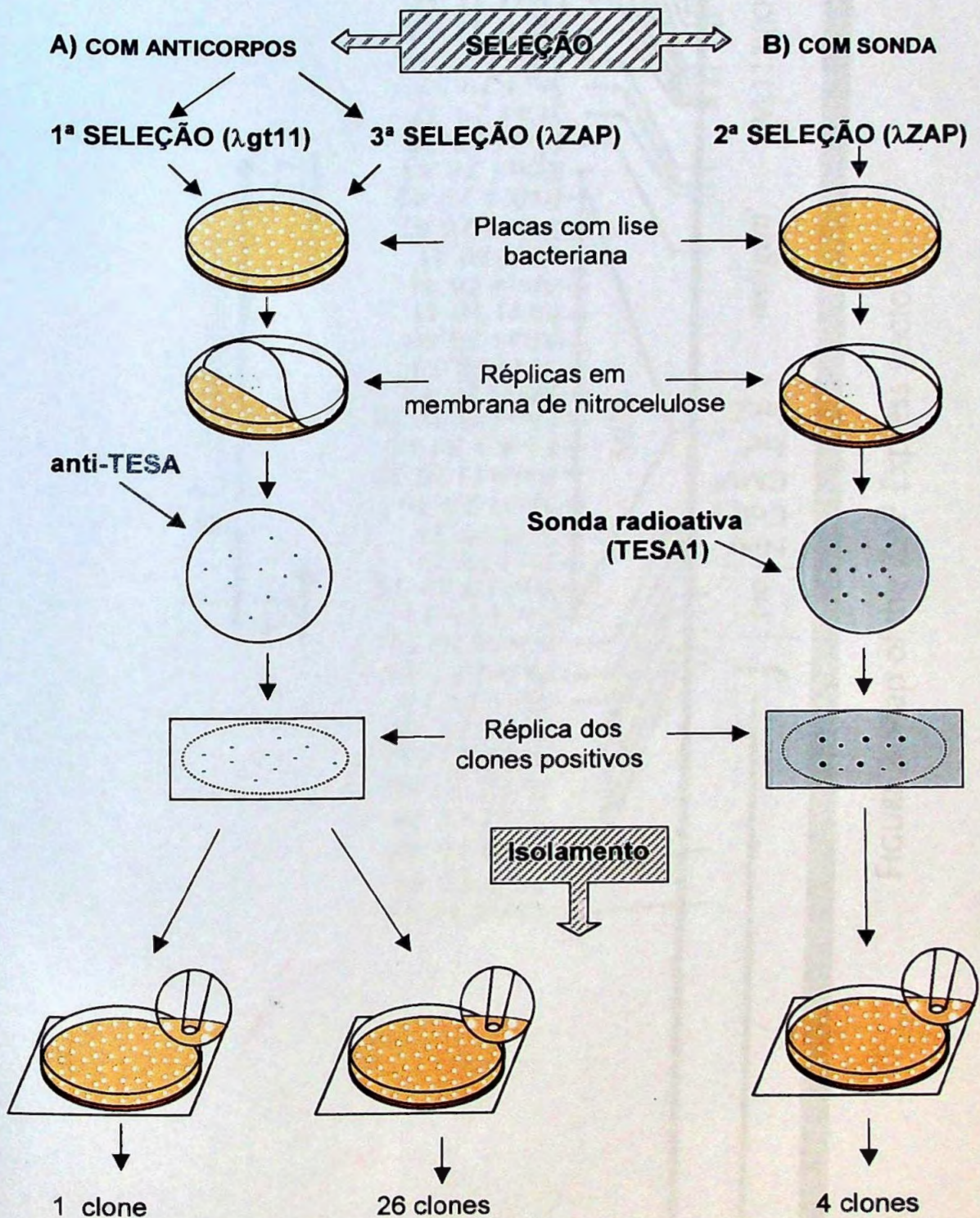
- TAKLE, G.B., O'CONNOR, J., YOUNG, A.J., CROSS, G.A.M. Sequence homology and absence of mRNA defines a possible pseudogene member of the *Trypanosoma cruzi* gp85/sialidase multigene family. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.56, p.117-128, 1992.
- TELLES, S., ABATE, T., SLEZINGER, T.C., HENRIQUEZ, D.A. *Trypanosoma cruzi* and human ubiquitin are immunologically distinct proteins despite only three amino acid difference in their primary sequence. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.24, n.2, p.123-130, 1999.
- TEIXEIRA, M.G.M., BORGES-PEREIRA, J., NETIZERT, E., SOUZA, M.L.N.X., PERALTA, J.M. Development and evaluation of an enzyme linked immunotransfer blot technique for serodiagnosis of Chagas' disease. **Trop. Med. Parasitol.**, Stuttgart, v.45, p.308-312, 1994.
- TOWBIN, H., STACHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.
- UMEZAWA, E.S., STOLF, A.M.S., ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: different surface antigens of trypomastigotes are targets of lytic antibodies. **Acta Trop.**, Amsterdam, v.54, n.1, p.41-53, 1993.
- UMEZAWA, E.S., SHIKANAI-YASUDA, M.A., STOLF, A.M.S. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas' disease. **J. Clin. Lab. Anal.**, New York, v.10, p.407-413, 1996a.
- UMEZAWA, E.S., NASCIMENTO, M.S., KESPER Jr., N., COURA, J.R., BORGES-PEREIRA, J., JUNQUEIRA, C.V., CAMARGO, M.E. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, n.9, p.2143-2147, 1996b.

- UMEZAWA, E.S., BASTOS, S.F., CAMARGO, M.E., YAMAUCHI, L.M., SANTOS, M.R., GONZALEZ, A., ZINGALES, B., LEVIN, M.J., SOUSA, O., RANGEL-ALDAO, R., FRANCO DA SILVEIRA, J. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.5, p.1554-1560, 1999a.
- UMEZAWA, E.S., FRANCO DA SILVEIRA, J. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n.1, p.285-288, 1999b.
- UMEZAWA, E.S., NASCIMENTO, M.S., STOLF, A.M.S. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.39, p.169-176, 2001a.
- UMEZAWA, E.S., STOLF, A.M.S., CORBETT, C.E.P., SHIKANAI-YASUDA, M.A. Chagas' disease. **Lancet**, Washington, v.357, p.797-799, 2001b.
- VAN VOORHIS, W.C., EISEN, H. FL-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. **J. Exp. Med.**, New York, v.169, p.641-652, 1989.
- VAN VOORHIS, W.C., SCHLEKEWY, L., LE TRONG, H. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the FL-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington v.88, p.5993-5997, 1991.
- VAN VOORHIS, W.C., BARRET, L., KOELLING, R., FARR, A.G. FL-160 proteins of *Trypanosoma cruzi* are expressed from a multigene family and contains two distinct epitopes that mimic nervous tissues. **J. Exp. Med.** New York, v.178, p.681-694, 1993.
- VAN VOORHIS, W.C., PHAM, V.T., VOS, T. The FL-160 genes of *Trypanosoma cruzi* are dispersed on multiple chromosomes. **Exp Parasitol.**, Orlando, v.80, p.578-582, 1995.

- VÉLASQUEZ, E., REYES, L., THORS, C., MIETTIMEN, A., CHINCHILLA, M., LINDER, E. Autoantibodies give false positive reactions in the serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.87, p.35, 1993.
- VERGARA, U., LORCA, M., VELOSO, C., GONZALEZ, A., ENGSTROM, A., ASLUND, L., PETTERSSON, U., FRASCH, A.C.C. Assay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.29, n.9, p.2034-2037, 1991.
- VERGARA, U., VELOSO, C., GONZALEZ, A., LORCA, M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas disease using synthetic peptides. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.46, n.1, p.39-43, 1992.
- VOLLER, A., DRAPER, C., BIDWELL, D.E., BARTLETT, A.A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas disease. **Lancet**, Washington, v.1, p.426-429, 1975.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas Disease. Geneva: WHO, 1991. 95p. (WHO technical report series, n.811).
- WIZEL, B., PALMIERI, M., MENDOZA, C., ARANA, B., SIDNEY, J., SETTE, A., TARLETON, R. Human infection with *Trypanosoma cruzi* induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.102, n.5, p.1062-1071, 1998.
- WRIGHTSMAN, R.A., DAWSON, B.D., FOUTS, D.L., MANNING, J.E. Identification of immunodominant epitopes in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface antigen-1 protein that mask protective epitopes. **J. Immunol.**, Bethesda, v.153, n.7, p.3148-3154, 1994.
- YAGER, R.G., MILLER, O.N. Effect of malnutrition on susceptibility of rats to *Trypanosoma cruzi*. V- vitamin A deficiency. **Exp. Parasitol.**, Orlando, v.14, p.9-14, 1963.

- YOKOYAMA-YASUNAGA, J.K.U., PRAL, E.M.F., OLIVEIRA Jr., C., ALFIERI, S.C., STOLF, A.M.S. *Trypanosoma cruzi*: identification of proteinases in shed components of trypomastigote forms. **Acta Trop.**, Amsterdam, v.57, p.307-315, 1994.
- YOUNG, R.A., DAVIS, R. Efficient isolation of genes by using antibody probes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.80, n.5, p.1194-1198, 1983.
- ZINGALES, B., CARNIOL, C., DE LEDERKREMER, R.M., COLLI, W. Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.26, n.1/2, p.135-144, 1987.

**ANEXO 1** - Diagrama representativo das três seleções de clones recombinantes das bibliotecas em  $\lambda$ gt11 com DNA genômico e em  $\lambda$ ZAP com cDNA do *Trypanosoma cruzi*.





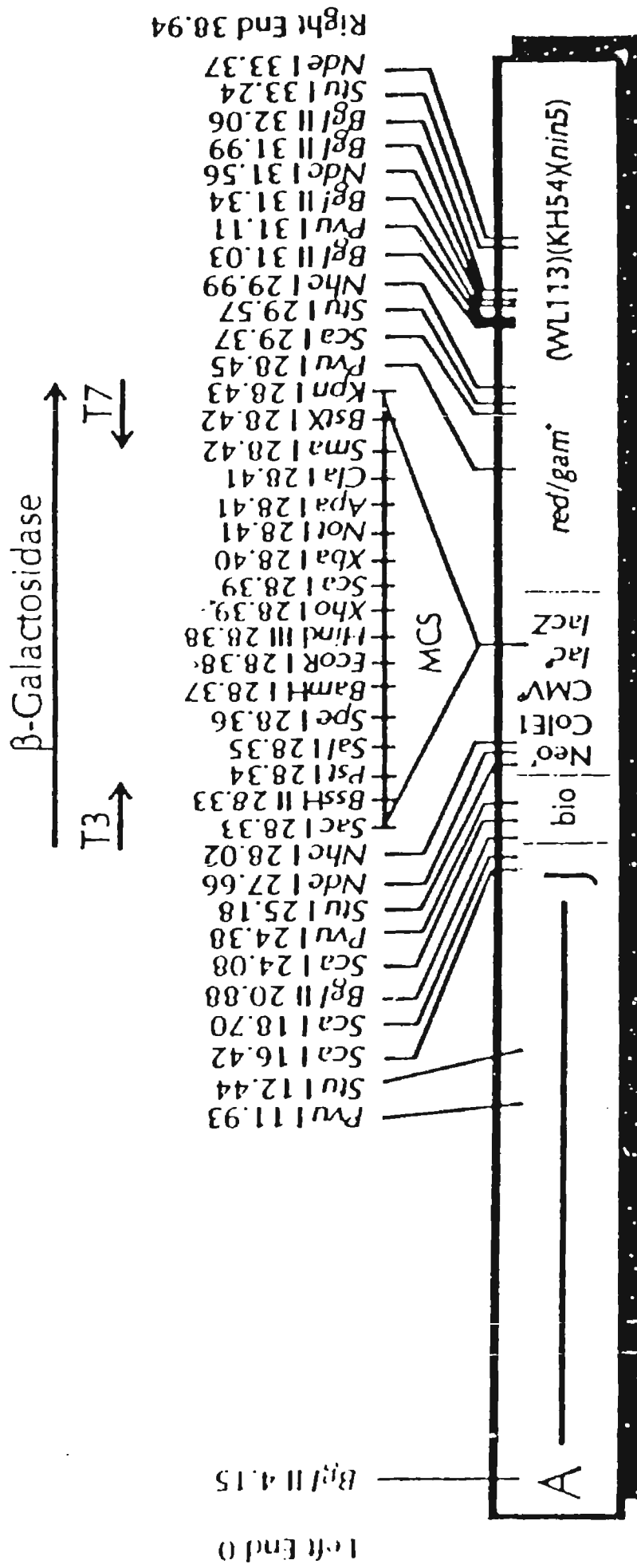


FIGURE 2 Map of the ZAP Express vector.

The pBK-CMV phagemid vector is 4518 bp.

**PROKARYOTIC EXPRESSION**

*lac* promoter: (1181-1220 bp) IPTG inducible.  
*lacZ* gene: (1183-1410 bp) (ATG 1183 bp and TAA 799 bp) The coding sequence of the *lacZ* gene provides a complementation for blue-white color selection of recombinant phagemids. The inducible *lac* promoter upstream from the *lacZ* gene also permits fusion protein expression with the  $\beta$ -galactosidase gene product.  
 Multiple cloning site (MCS): [*Sac* I-*Kpn* I (1126-1019 bp)] Multiple cloning site with 17 unique sites flanked by T1 and T7 promoters. (Please see the polylinker sequence below.)

**EUKARYOTIC EXPRESSION**

CMV promoter: (1895-1306 bp) Eukaryotic expression is driven by the CMV immediate early promoter.  
 SV40 poly(A): (751-469 bp) The SV40 polyadenylation sequence provides signals required for termination of eukaryotic transcription and polyadenylation.  
 Cloning sites: Sites located within the MCS (for either prokaryotic or eukaryotic expression. Cloning between the *Mhr* I site (5') and the MCS (3') allows high-level eukaryotic expression when the insert contains an ATG and Kozak sequence.

**PROKARYOTIC SELECTION**

Neo<sup>r</sup>-Kan<sup>r</sup>: (4034-3032 bp) (ATG 4100 bp and TGA 3222 bp) Neomycin- and kanamycin-resistance gene driven by the  $\beta$ -lactamase promoter (*U<sub>lac</sub>*) in bacteria.

**EUKARYOTIC SELECTION**

G418: (4393-2760 bp) Stable selection of clones in eukaryotic cells is made possible by the presence of the neomycin- and kanamycin-resistance gene (4034-3032 bp), which is driven by the SV40 early promoter (4393-4036 bp) with TK transcription, termination, and polyadenylation signals (3031-2760 bp).

**REPLICATION ORIGINS**

f1 (-) origin: (462-4 bp) f1 filamentous phage origin of replication allowing recovery of the antisense strand of the *lacZ* gene when a host strain containing the pBK-CMV phagemid vector is co-infected with helper phage.  
 ColE1 origin: (2759-1896 bp) Plasmid origin of replication used in the absence of helper phage.  
 SV40 origin: (4393-4036 bp) Eukaryotic origin of episomal replication. Requires expression of SV40 T antigen to be functional.

Please Note: In the polylinker sequence below, the upper strand is designated the (+) strand, and the lower strand is designated the (-) strand.

BK Reverse Primer 5' ACAGGAACAGCTATGACCTTG 3'  
 T3 Primer 5' AATTAAACCTCACATAAGGG 3'

1200 MET T3 promoter +1 → Sac I BstX I Spe I Sma I EcoR I  
 5' TCACAGGAACAGCTATGACCTTGATACGGCAAGCTCGAATTAAACCTCACTAAGGGACAAAAGCTGGAGTCCCGCCGCTCGACAGTGGATCCAAAG  
 3' AGTGTGCTTTGTGTCAGTAACTGGCAATAGCGGTTTCCCTTGTTCGACCTCGAGCGGGGACGTCAGGTGTGATACCTAGGTTTCTAA

1183  $\beta$ -Galactosidase →

Hind III Xba I Not I Apa I Cla I Sma I Kpn I  
 AATTCAAAAGCTTCTCAGAGTACTTAGAGCGCGGGCCCATCGATTTCACCCGGGTGGGTACAGTAGTACCCAAATGCGCCCTATATGATGCTTTCATTCACCTGGCGTTTACA 3' (+)  
 GTTTTTCGAAGAGCTCTCATGAAGACTTCGGCGGGCCCGGGTAGCCAAAAGGTGGGCCACCCCAAGGTCATTTCAGTGGTTAAGCGGGATATCACTACACATAATGTTAAGTACCGGACCAAAATGT 5' (-)  
 951

3' CGGGATATCACTAGCATAATG 5' T6ACGGCAGCAAAATE 5'  
 T7 Primer M13-20 Primer

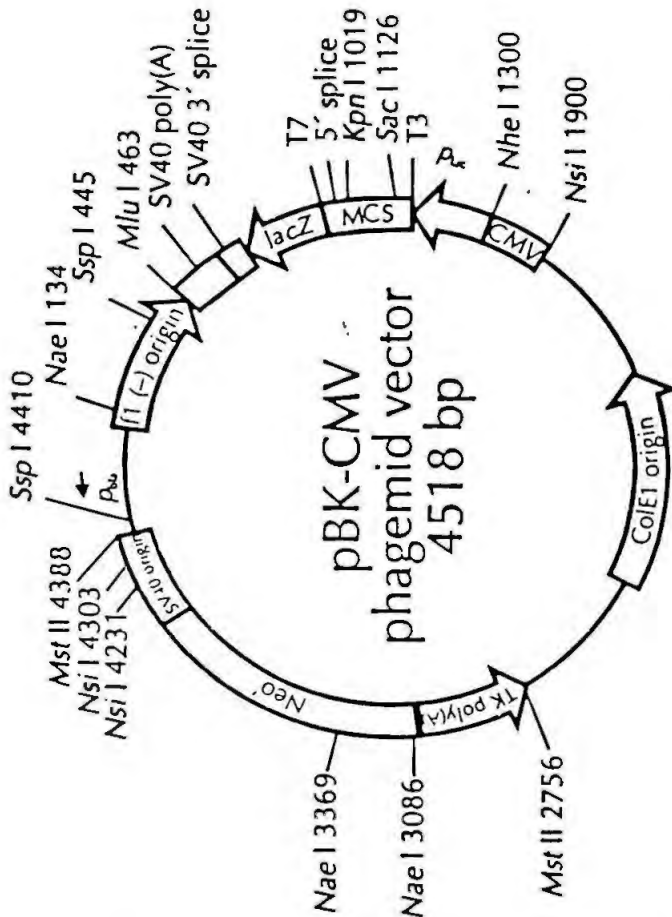


FIGURE 3 Circular map and polylinker sequence of the pBK-CMV phagemid vector.

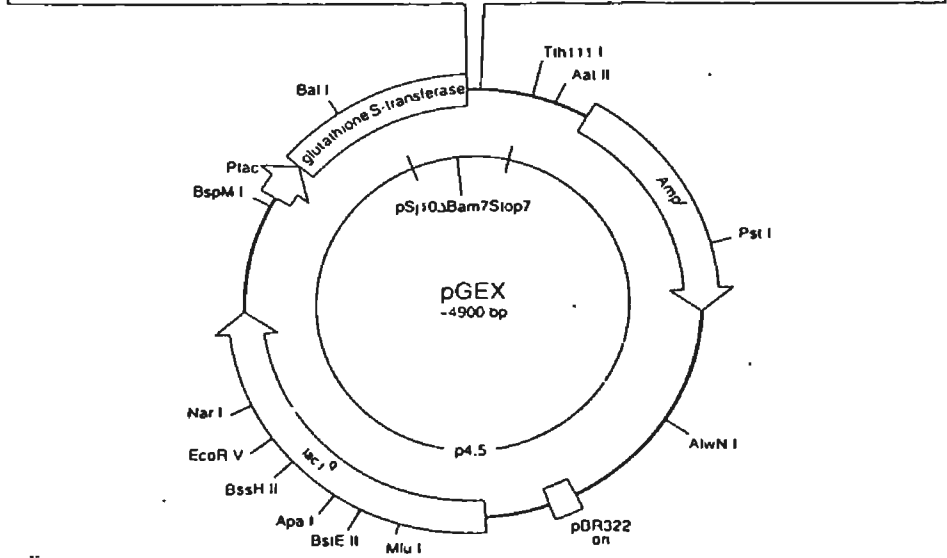
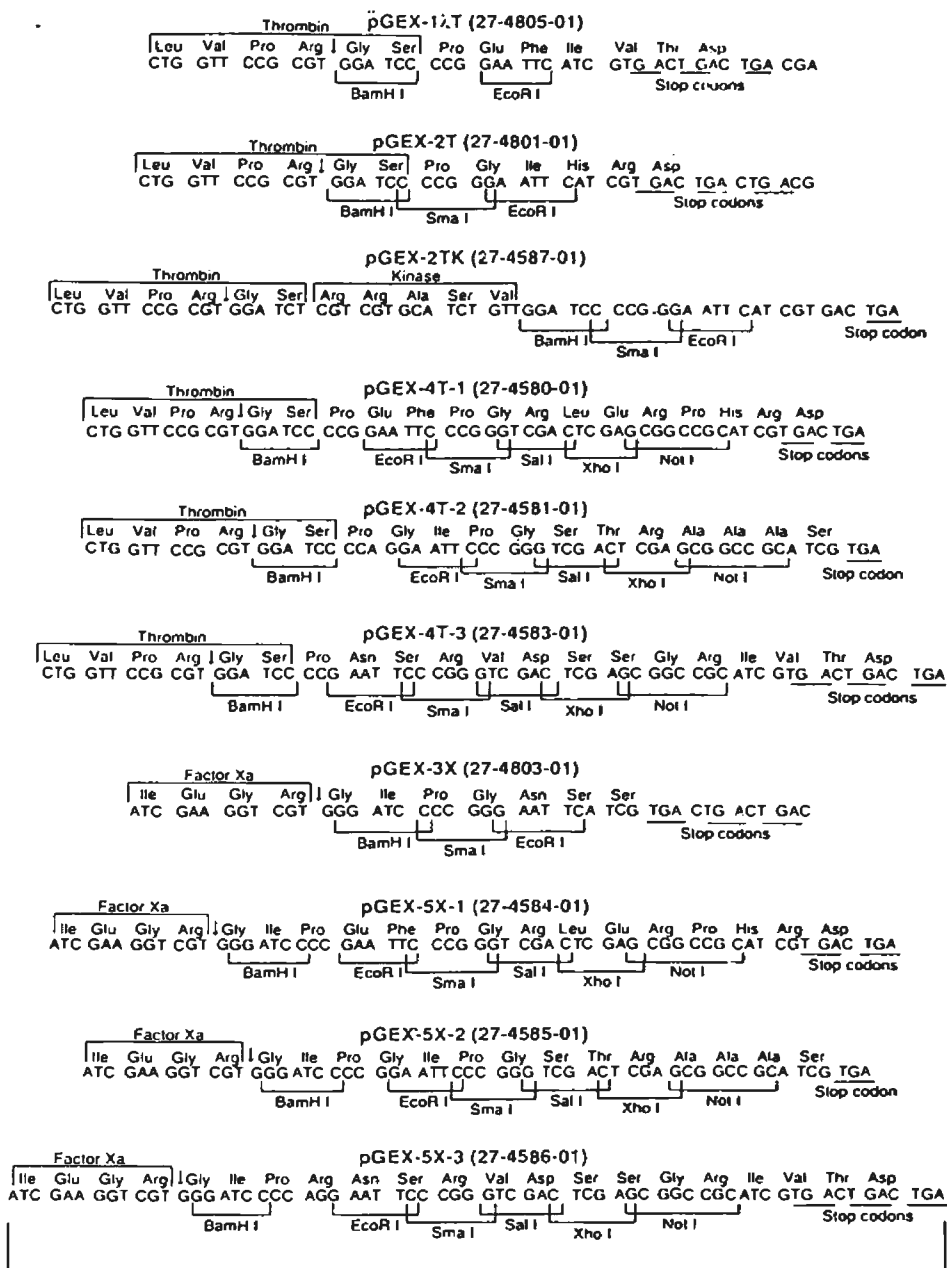


Figure 1 (above). Map of the glutathione S-transferase fusion vectors showing the reading frames and main features.

Sequenciamento parcial de 4 clones recombinantes selecionados da biblioteca em  $\lambda$ ZAP de cDNA do *T. cruzi* com a sonda do TESA-1

CLONE 12a (441 bps)

AAGCGCCACACACAGCCACGCCCTGCCCCCGTGTTCCTTTTTGCTGCGCTCACTCTCCCAAT  
AAAGTGACGCGACTCCCGTCATGCTGCGTTCTTCTCTCAGTCCACACACACACGAGTGACTATGCTC  
TGCGGGCCGCACTCACACGCCGATGAGAGGGCTGAGGGGAGCAGCAACACGCGATGACCCCATG  
AAATATAACGATGTGCGGTCACACGGAGGGTCGGACGGTTGAAAGACATTTAAATATCTTTAATTTT  
ATTTTCGGACAAAATGTGCAGACAATTTCTGGAGCAATATGGTAGTTAGGTGCTTTTTTGTGTGGTT  
CTTTGTGTGGATTTTTCTTTTTTTTTCATTTTTTTTCATTTTTCTTCTTTTTAAAGTGTGAGGGGT  
GAAAGGTGAAGATGAATTTTTTTAATTT

CLONE 15b (807 bps)

TGCTGGGCCCCCTTCCCCGAAAAAGGACCCGACCTGCCGTCATGTCTGCGTTCTTCTCTCAGTCC  
CCACCTACACCCGAGTGACTATGCTTTGCGGGCCGCACTCACACGCCAATGAAAGGGCTGAGGGGA  
GCAGCAACACCGCAGATGACCCCATGAAATATAAACGATGTGCGGTCACACGGAGGGTCGGACGGT  
TGAAAGACATTTAAATATCTGTGCAGACAATTTCTGGAGCAATATGGTAGTTAGGTGCGTGTGTGGAT  
TTTTCTTTTTTTTTCATTTTTTTTCATTTTTCTTCTTTTTAAAGTGTGAGGGGTGAAAGGTGAAGAT  
CCCGAGGCGGATCAACGGGGGGAGTTGTTTGATATCATTGAGAACCCAACACGGAGCTTGAAAGT  
CAACAAAGCGTTTGTGCTTGCCTACTGAAAATGACGACGTGCGGTCCACTGGTACCGGGACCACTGGC  
GCGAGAGGGGGGGGGACGGGAAGTCCGAGAGAACAATGAAACGCCAGGCAGCAGGCCTAAATCC  
TTCAAAAGAGTGACGCCCAACCCGACATCCGGGGGAGGACACCCGAACAACATCTCTTAGGGACTG  
GAAGGGAAGTGAAGTTCTTTCTGAAGGACGGCAAAGGAAGGTGCCCAAACCGACCGACAACCC  
GGACCCGGGTAAATACAAAACACAGCGCCTGGGGGAAAAACCGAGTATCTAATGAGGAGCCCAAC  
GCAAAAAACACCCCTCGGAACACCTGGGAATTTTTGCTTGAAGAAACGGGGCCATTTGGGCCGAAGT  
TGG

CLONE 16a (448 bps)

TTTGCTGCGCTCACTCTCCCGATAAAGTACGCGACTCCCGTCATGTCTGCGTGCTTCTCTCAGTCCC  
ACACACACGAAGTGACTGTGCTCTGCGGGCCGCACTCACGCACCAATAAACCGCTGAGGGGAGCAC  
CAGCACGCAGATGACCCCATGAAATATAAACGCTGTGCGGACACACGGAGGGTCGGACGGTTGAAA  
GACATTTAAACATTTCAATTTTTAATGTGCGGGCAAATATACAAACAGTTTGGTGGGCGCACACAGTAA  
CCAGTGAATTTTTTTTTGTGTGGTGTGTGTAGCCGTAATAGAGGACGACATTTTTCTTTTTTTTTCT  
TATTGTTTCCAAAGTGTGAGGTGTGGGAGGTGAAGATCATTTTTTAAAAATTTTAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAGGGATAGTTACAAAAGACATCAATAATTTTTTTT

CLONE 25a (766 bps)

TTTTTGCTGCGCTCACTCTCCCGATGAAGTGACGCGACTCCCGTCATGTCTGCGTGCTTCTCTCAGT  
CCCCACACACACGAGTGACTGTGCTCTGCGGGCCGCACTCACGCACCAATAAACCGGCTGAGGGGA  
GCAGCAGCACGCAGATGACCCCATGAAATATAAACGCTGTGCGGACACACGGAGGGTCGGACGGTT  
GAAAGACATTTAATCAATTTTTAATGTGCGGGCAAATATACAAACAGTTTGGTGGGCGCACACNCA  
GTAACCAAGTGAATTTTTTTTTGTGTGGTGTGTGTAGCCGTAATAGAGGACGACATTTTTCTTTTTTTT  
TTCTTATTGTTTCCAAAGTGTGAGGTGTGGGAGGTGAAGATCAGAGAGAACACCGAACTCAGACAG  
CAGCCTCACTCCTTCAAAGAGTGACGCCGAACCTACAACCGCGGAGGACACCGACAACATCTCTCGG  
ACTGAGAAGGCTGAATTTACCGTTGAAAACGGCGAGGAGGTGCCACAGACGGTCGACACCGCACCG  
GGTAACAAAAGCACCACGCCTGGGGAAACCGAGATCCCATCGGAGTCCAACGCAACAAAAGGCGCG  
GCACGACACTCGGACAACGACACCTTACCGGGGAAATCGCGGAGCTGCGGCCCATGGGTCTAAAC  
CGTGACAGCACCGTGCATGGGTATGTGTCTCGGGTGTGGTGCATGCTGCTTCTGGGGCTGTGGGG  
CACTGCGAGGTGTGGNGGGTGAAGATCA

Sequenciamento parcial de 26 clones selecionados da biblioteca em  $\lambda$ ZAP de cDNA do *T. cruzi* com anticorpos anti-TESA purificados de soros de pacientes chagásicos

CLONE 1 (172 pbs)

CCTCAGCTGGTGTGGAAATGGTGGAAAGAAGAGTCACCTGGCAGCGTGCCTTGCACCTGCATCGTCAC  
AAAAGCAGAACGCGCAGTCATGAGTTACTTGGAAACCGAGATGCCGTGCAGTGGGTGCACCTTTCCAC  
CCAATATGGATTCACCGCTGACGGGGCAGGTGGACAC

CLONE 3 (188 pbs)

CGACTCCCAGCGACAGGCGACGAAGGATGCCGGCAGCATCGCGGGGATGGAGGTGCTGCGCATCA  
TCAATGAGCCGACAGCTGCCGCCATTGCGTACGGCCTGGACAAAGTGGAGGACGGCAAGGAGCGCA  
ATGTCCTCATCTTTGACCTTGGCGGGCAGCTTTGATGTCACGCTGCTGACGATCG

CLONE 7 (666 pbs)

CAAGCCTTGACCCGTGATGGAAAGAACGTTTTCTTTGGTCATCCTTGCCAACGGTACTTATTATGGTTG  
GGAGTTCTCGGAGGATACGAGTGATGAGGGATGCATCCAGCCTGCGGTCTTGAATGGAATGATGAA  
ATTATCATGATGACGTCGTGTGATGACGGCAGCGGTTTACTGGTCAAGCGCCATGGGGAGAT  
GGTGGTACGAGGAATACGACACTCTTTCACGCGTGTGGGGCAACTCGCTGAATCGTACAGGGCACG  
GCGTGCAGGGTGGCTTCGTCAGCGCGATGATCGATGGACAGAAATACATCCTCGTCAGTCGGCCGG  
TATATGCTGAGAAGAACGGTAAAGAAACGGGGCCGACTTCACCTGTGGCTGACGGACATGCAACGAA  
TTTATGATGTTGGGCCGATATCCGCTGAGAATGAGAACGTCGCCGCCAGCACTCTGCTGTACGCCAC  
GGTCAAGCGCAGTCATTGAAAAAGGAAGGACCGAAGAAGAGAAGAACTGTACTGCTCGTACGAGG  
TTGCTGCAGAGGGAGATAACTACCACATTACTTTTTGTGGACCTGACGGAGAAGCTGGAGGAGATGAA  
GAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAGGACCGGTACATTGCGAGGGAACACGGCTGCGGGAAT

CLONE 10 (473 pbs)

GGAATGATGAAATTATCATGATGACGTCGTGTGATGACGGCAGTCCGCGAGGGTTTACTGGTCAAGCG  
CCATGGGGAGATGGTGGTACGAGGAATACGACACTCTTTCACGCGTGTGGGGCAACTCGCTAACTCC  
TACAAGGCACGGCGTGCAGGGTGGCTTCGTCAGCGCATGATCGTGGGACAGAAATACATTCTCGT  
CAGTCGGCCGGTATATGCTGAGAAGAACGGTAAAGAAAGGGCCGACTTCACCTGTGGCTGACGGAC  
ATGCAACGAATTTATGATGTTGGGCCGATATCCGCTGAGAATGAGAACGTCGCCGCCAGCACTCTGC  
TGACGCCACGGTCAAGCGCAGTCATTGAAAAAGGAAGGACCGAAGGAAGAGAAGAACTGTACTG  
CTCGTACGAGGTTGCTGCAGAGGGAAATAACTACAACATTACTTTTTGTGGATCTGACGGAGAAGCTG  
GAG

CLONE 11 (743 pbs)

ATTAGGATGGAGGACAAAAGTCGCTATTTGCTGCCTATTCAAGCCTTGACCCGTGATGGAAAGAACGT  
TTCTTTGGTCATCCTTGCCAACGGTACTTATTATGGTTGGGAGTTCTCGGAGGATACGAGTGATGAGG  
GATGCATCCAGCCTGCGGTCTTGAATGGAATGATGAAATTATCATGATGACGTCGTGTGATTACGGC  
AGTCCGACAGGGTTACTGGTCAAGCACCATGGGGAGATGGTGGTACGAGGAATACGACACTCTTTC  
CGCGTGTGGGGCAACTCGCTGAATCGTACAGGGCACGGCGTGCAGGGTGGCTTCGTCAGCGCGAT  
GATCGATGGGACAGAAATACATTCTCGTCAGTCGGCCGGTATATGCTGAGAAGAACGGTAAAGAAA  
CGGGGCGACTTCACCTGTGGCTGACGGACATGCAACGAATTTATGATGTTGGGCCGATATCCGCTGA  
GAATGAGAACGTCGCCGCCAGCACTCTGCTGTACGCCACGGTCAAGCGCAGTCATTGAAAAAGGAA  
GGACCGAAGGAAGAGAAGAACTGTACTGCTCGTACGAGGTTGCTGCAGGGGGAAATAACTACAACA  
TTACTTTTTGTGGATCTGACGGAGAAGCTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAA  
GGACGCGTACATTGCGAAGGGACACGGCTGCGGGAATGAATGGAGGAATAATTGGCACCGTGACTG  
TGGTGA

CLONE 14 (580 pbs)

GAATTGCTGCTGTGTGCTGTGTGTGTAAGAGATGAAGGGAGAAATAGCGGAGGCGGCGGATTTAG  
TCAAGACTCTTCTCAAGGCCGATGAGGAATGCCGTGAGCTTTCGGGATAAAGTTGCGACACTTGAGAA  
GACGTGTGCGTAAGAGAGCGGGATGTCCGGGGCAGTCGGCGCAACTCTTCAGATGGCAACCGGAAC  
CTCGAAAAAGATCAAGTGTGCGACAATCACTCTTCCCATTGAGGTGGTTGGTGAGCTGAATTTCAAGG  
CCGGTGTGTCACATTACTGTTAAGGGAACAGAAAAAGCTGTTGAAGGAGAAGAAACAACCTTGAAGAA

ATATTGAGGAGTTCTGCGGGCGGCTACAGAAGTGGTCAATGAACTCAACACCGATTTAAAGGGACGCA  
TTGGGTACACCGATGGGGAGACTTTGCTACATTTGAAGGACGCGTCGGACACTGTGGCTTACAAGAA  
CGGACTGAGGCACGACATTTTACAGTCGCTCCGTGATCGTGAACCATTCAAACGCCCTGGAACGGC  
AAACACAGCATATGCGAGGGGCTTCTGGCGGAATTGGTTAAAT

### CLONE 15 ( 513 pbs)

GGACAGAAATACATTCCCTCGTCAGTCGGCCGGTATATACCGAGAAGAACGGTAAGGAAACGGGCGGA  
CTTCACTTGTGGCTGACGGACATGCAACGAATTTATGATGTTGGACCGATATCCGCTGAGAATGAGAA  
CGTTGCCCGCCAGCACTCTGCTGTACGCCACGGTCTGAAGCGCAGCCATTGAAAAAGGAAGGACCGAA  
GGAAGAGAAGAACTGTACTGCTCGTACGAGGTTGCTGCAGGGGGAGATAACTACAACATTACTTTT  
GTGGATCTGACGGAGAAGTTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAGGGACGC  
GTACATTGCGAGGGAATACGGCTGCAGGAATGAATGGGAGAAGTATTGGCGCAGTGACTGTCATGAA  
GCCCTACTAAAGGGCTGTTGGCTTCTTATCCAACACGTCAACTGACAGCACGTGGGCAGACGAGT  
ACCTCGGGGTGAATGCCACAGTGAACAAAGGGGAAGCCAGCGGCGG

### CLONE 16 (564 pbs)

CCCAAAGTAATTCTAAACCATTATTTTCTATTCCCCTATATTATGCCCTCTGCTAAAAATAAACGAGGT  
GCTCATGAACCCGTGAAAAACGAATAGTGTAAAACCCCTTATGCCCTGTGTCCGGAGACTTCTTACAT  
GTGTCATCTTCCGTGCTTATCATTGTTTTTTTATCTCTACCGTAGGAAATCATGGTGATGTCTCTTCTAA  
ACCTCACAGGATAAAGTTGAGTAATTAATTTTATATTTTGAATTTAAAAAAGAAAAATAATTTTCTGT  
CTTTTTTGGGTGGGTGCAGGATGCCAATGGCAAGCAGTACTCGCCGTGCGAGGTGGGTGCGTTCGT  
GCTGGAGAAGATGAAGGAGACGGCGGAGAACTTTCTTGGCCGCAAGGTGTCGAACCGGTGGTGAC  
GTGCCCGGCGTACTTCAGGCGACGCGCAGCGCCAGGCGACGGAGGACGCCGGGACGATCGCCGG  
GCTGAACGTGATCCGCGTGGTGAACGAACCGACGGCTGACGGCACTCGCGTACGGACTGGACAAGA  
CGAAGGACAGCATGATCGCCGTG

### CLONE 17 (720 pbs)

GGTTGCTGCAGAGGGAGATAACTACAAAATTACTTTTTGTGGACCTGACGGAGAAGCTGGAGGAGATG  
AAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAGGACGCGTACATTGCGAGGGAACACGGCTGCGGGAAT  
GAATGGAGGAATAATTGGCACCGTGACTGTGGTGAAGCCCTCACTAAAGGGCTGTTTGGCTTCTTATC  
CAACAAGTCAACTGACAGCAGTGGGCGAGCAGTACCTCGGGGTGAATGCCACAGTGAAGAAAGG  
GAAGCCAGCGGCGGATGGTGGATTGACGTTTGAAGGTTCCGGAGCAGGGGCGGAGTGGCCTGTTG  
GCAAAATGGGCGAGAATGTCCGTACTACTTTTGCGAACACTCAAGTTCACTCTTGTGGCGACAGTGT  
CATTACAAGGAGCCGAAGGGGAAGCAGCAGCTCTATCCCTTTGATGGGTGTGAGGATGAACGATGCA  
CAAGGCACCCTGCTCTTTGGTCTGTGTCACCCACGGAAAAGAAGTGAAGGTAACATTCGGTGAG  
AGTCTTCGGAATTTCTCGGCGCATGATTACGGTGTGGATGGGAAACAACAAAAATATCAGGTGGC  
ACTGGAATGCATCATTATGATGGCGTGAGTGTGTACGTGGATGGAGAGGAGATATACTACACCAA  
GATTATGAGGACGGGGAGGATTACGGCTTTACTCAAAAGCTACGAACGCTGT

### CLONE 18 (709 pbs)

GGCCAAAACGCCATCTTTAAGGCTGGGTTTGATGGCGTTGAGATTCATGGAGCCAACGGCTACTTA  
CTGGACGCCTTTTTTCGCGAATCTTCCAACAAGCGCCAGTCCGGTCCGTACGCCGGAACGACCATCG  
ACACAGATGCCAACTCATCTACGATGTACCAAAAAGCGTCTGCGATGCCGTGGGAAGTGACCGTGT  
GGGGCTCCGATATCCCACTAAATGGCGTGCATGGGATGATTGACTCGAACCCGGAGGCACTAACC  
AAGCATCTATGCAAGAAAATTGAGCCACTTTTCGCTTGCCTATCTGCATTACTTGCAGCGGCGACATGGT  
CAACCAGCAGATTGTGTGTACGTTGTGGCGTGTGGTTCGTGGAAGTTACAGCGGGTGTAAAAATATC  
AACCTGAATTGGAATAATCAGCACCCCTGTGTGGTTTTCCCCCAAAATGGTTCGCTTCTGCACATCGTCA  
TGAGTGATGTGTTTTCCCCCTCTTGTGCTTTGCTTTTGTGCCCACACGCGGTGCCGGCCCTATTGT  
CGTGCGTCCCACGGACTGCACGAGAGGAGGATTGGAGGACAAGCCGGGATCCCGCATGGAATGTGA  
AGAATTTGTGTGCTGTGGCAATGTGTTTTTTTTGTTGTTTCTGTGTGGACAGTATGTATGAACT  
TCAAAAACACGGTCTATTGATACTCCAGAGGAA

### CLONE 19 (360 pbs)

GGCACGAGGGGATTTATTATAACCTTTGAATTGTGATGTTTACGGCTTCCCGGATGTGCAGATAGCA  
CCCCGTGACACGGTTATCAGCGAGGAGTCCACTTGCATGATAAGGAGGGTTCGCATGGGGACATTAC  
TGCAGCCCATGGCACAGAGGATGCGCATCTCCTTTTCTGCATTGACATGTCTTGGTAGTTATGCACAG  
AATGCCACGTGTCCACTACGCCTTTTTTGTGCCGGCTTTGCGGCGTGCAGCTCAATGAAACGATTGA  
GGTAACGAA TTTGCTGCCCCCGTCAACCCCGACCGCCGGAGACGAAGACGCCTGAACAACG  
TGAGAAGGCGGCTATTGGCGCCCA

CLONE 20 (496 pbs)

GGCACGAGCTGTAATAATTGTAGTCGCCTCAACGCCGAGTCTTTTTTTTGGCTGTGCGTGTGTTCT  
CTTTTTGGTTCTACCGTTAACGTTCTTCGCGGCTGTTCTCGTTGGCCACCCCGTCTTCTTTTTGAA  
GGCAAATGTCTGAGACGGTTTTCTGCGCGCCCGGAGGATGTTTTTTGGAATGGCTGGTGGGGGTG  
GTCCCTGGCGTTCGCAACGTCGGTGTGCTGCTTTGGAACGGCGAAGGCGGGTGGTGCGGTGGCGCA  
CCTTGGTATCGTACAGCCCCGGCCGTGTGATGCGGGCATTGTGCTGTGGTGTGGTGGTATTTTG  
GGCATCTACGGCCTCATTGTCTCCGTATCATTAGCAACAACATGAAGACGCCGGCTACATGCTGTT  
CTCGGGTTATATGCATCTTGGCGCGGGCTTGCGGCAGGCATCGCATCCTTGCCGCCGGTTACGCCAT  
TGGCATTGTCCGTGAGATTTGCTGCT

CLONE 27 (276 pbs)

ACGACGTGAAAATTGACCGCCTGTTGAGCCAACTACCATTGCGAACGGTAATAGTTATGATACAAAT  
GCTCTTGTGCGGGGTTATGGCACGTCAACGACTCCATTGACGGAGTTGACTGATGGTAAATATTGGAT  
GCCAGGATGGCGGAAGTTATGGGTGCGGCTTACAAAGACGATGAGGAAAAGGAAAAGTTTGAGTG  
GAAACAGTTTGAATCACGTCGAAACTTCTTATGACTTTTGAAGAACAACAGCGCTAACCGCGACC  
GTTTCA

CLONE 28 (818 pbs)

GACAAGCAGAAAGTAATAAATAAACAGCGCTTTCATTCCCCACCCACACACACACATACGCACACAC  
AAACAAACACACACACACAAACACTCGCGTGTGCCATGGGACGGCACTCTGCGTCACAACACGA  
TTTGGCGTACGGCATGTGCTCAGATGTTGCTGTTAATTGATCGGTTTTGGGTGCTCATCGTCCGCAGC  
CGTGCACACGAGGTACCCGCGGCGACACGGAGGGAGTGGGGTGCATGGGGATGCTGAGTCCCAGC  
AAGTGTGCTGGGTAATTACGGTGCAGTCAAATAATGCAAGTCAATGTTTGCATTTTCCCA  
CTGATTTTTAAACAGGTTAAATATGCTATGTTATACCCCGTTGTTGTTGAACGTTTGAACAATTTTT  
GCGCAAAAATTGTTTCAAACGTTCAACAACAACGGGGTATAACATAGCATATTTAACCTGTTTAAAAAT  
ATCAGTGGGAAAATGCAAACAATGACTTGCATTATTTGTCAGTTTTGACTGCACCGTAATTACCCAGCA  
CACTTCGCGGGACTCAGCATCCCCATGCACCCACTCCCTCCGTGTGCGCCGCGGGTACCTCGTGTG  
CACGGCTGCGGACGATGAGCACCCAAAACCGATCAATTAACAGCAACATCTGAGCACATGCCGTGAC  
GCAAATCGTGTGTGACGCGAGGTGCCGTCCCATGGCGACACGCGAGTGTGTTGTGTGTGTGTGTT  
TGTTGTGTGTGCGTATGTGTGTGTGGGTGGGGAAATGAAAGCGCTGTTTATTTATTACTTTCTGC  
TTGTC

CLONE 29 (262 pbs)

CGTTTCTTTGGTCATCCTTGCCAACGGTACTTATTATGGTTGGGAGTTCTCGGAGGATACGAGTGATG  
AGGGATGCATCCAGCCTGCGGTCTTGAATGGAATGATGAAGAGCTTATCATGATGACGTCGTGTGA  
TGACGGCAGCCGAGGGTTTACTGGTCAAGCGCCATGGGGAGATGGTGGTACGAGGAATACGACAC  
TCTTTCACGCGTGTGGGGCAACTCGCTGAATCGTACAGGGCACGGCGTGCAGGGTGGCTTC

CLONE 30 (278 pbs)

GCCTATTCAAGCCTTGAAAAATAATGGAAGAAGCGTTTCTTTGGTCATCCTTGCCAACGGTTTTTATTA  
TGGTTGGGAGTTCTCGGAGGATACGAGTGATGAGGGATGCATCCAGCCTGCGGTCTTGAATGGAA  
GGAAAATGAGCTTATCATGATGACGTCGTGTGATGACGGCAGCCGAGGGTTTACTGGTCACGCACC  
ATGGGGAGATGGTGGTACGAGGAATACGACACTCTTTCACGCGTGTGGGGCAACTCGCTGAATCGTA  
CAGGGCAGC

CLONE 34 (320 pbs)

CGGACATGCAACGAATTTATGATGTTGGGCGGATATCCGCTGAGAATGAGAACGTCGCCGCCAGCAC  
TCTGCTGTACGCCACGGTTCGAAGCGCAGTCATTGAAAAAGGAAGGACCGAAGGAAGAGAAGAACTG  
TACTGCTCGTACGAGGTTGCTGCAAAAGGAAATAACTACAACATTACTTTTGTGGACCTGACGGAGAA  
GCTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAGGACGCGTACATTGCGAGGGAACA  
CGGCTGCGGGAATGAATGGGAGAATAATTGGCACCGTGACTGTGGTGAAGCC

CLONE 42 (460 pbs)

GGCACGAGGGAATAATAAAAAAACAAGACAAAACAAGCAAACCTAACAAAACAGCCTTCTCGCCCT  
TCACACAGGAGGAGGATAGAGAGAGAGAGAAAAAAGGGACAACCCACTTACACGAGG  
GCAAAGGGGCATGCCGTGAGAAGTATGGACTATAATCTTGAATACAGCGAGGAGCAGCGAGAGTGCC  
TTGAGCGTGTGCGGATGCGCGAGTATCTCGAGACCTTCTGTTGCCGAGGTCGTTCCGCAAAAGCCAAA  
TGACATATACGCCTTTTTGATGACTGGGCAAGCGCACACTGCCAGAAAGAAAACGAAAATGACGCCA  
ACAGAAGCTCCATCAAGATTGAGTGCAGCACACGTCAAAACCTTGGCAAATAAAGAGATGCGAACCG  
GACAGCGCAAGTAATGAGCTTTTAGAGCAGGAGGAGACGGAAAGAGTCGGACAGGTT

**CLONE 43 (476 pbs)**

GAAAAGAAGTGAAGGTAACATTC AATGAGAGTCTTCGGAATTTCTCGGC GCATGATTACGGTGTGG  
ATGGGAAACAACAAAAATATCAGGTGGCACTGGAAATGCATCATTATGATGGCGTGAGTGTGTACG  
TGGATGGAGAGGAGATATACTACACCAAAGATTATGAGGACGGGGAGGATTACGGCTTTACTCAAAA  
GTTACGAACGCTGTTGAGCTCCCACGGCATCTCCGCACTTTAACATTGGCGGGGACAATCACGAGC  
AACTCGGACGACATTAATGTGACGGTGAGAAACGTCCTGCTGTACAACCGCGCTTTGAACGAAGCAA  
AGCTCAATGCGTTAATGAAGAGGAACACAGTCGCTGCTGCAGCGGCGAAGGTGCAGGCCAGGAAG  
TTGCGGCTCAGACTACGAATGTGAGTGAACCTTCTCATCCGGC~~CA~~ATGTGCCGTCGTCACGCCTGA  
AGCGCA

**CLONE 47 (1471 pbs)**

GCTTTGCTGGGTGCGAGCCTGGACTCTTCTGGTGGCAAAAACTCCTGGGGCTCTCGTACGACGAGA  
AGCACCAGTGGCAGCCAATATACGGATCAACGCCGGTGACGCCGACCGGATCGTGGGAGACGGGTA  
AGAGGTACCACGTGGTTCCTTACGATGGCGAATAAAATTGGCTCCGTGTACATTGATGGAGAACCTCTG  
GAGGGTTCAGGGCAGACCGTTGTGCCAGACGAGAGGACGCCTGACATCTCCCACCTTCTACGTTGGC  
GGGTATAAAAGGAGTGATATGCCAACCATAAAGCCACGTGACGGTGAATAATGTTCTTCTTTACAACCG  
TCAGTGAATGCCGAGGAGATCAGGACCTTGTCTTGAGCCAGGACCTGATTGGCAGGAAAGCACAC  
ATGGGCAGCAGCAGCGACAGCAGTGCCACAGAACGCCCTCAACTCCCGCTGACGCAGTGCACAC  
AGGACGCCCTCGACTCCCGCTGACAGCAGTGCCACAGAACGCCCTCAACTCCCGCTGACAGCAGT  
GCCACAGAACGCCCTCGACTCCCGCTGACAGCAGTGCCACAGTACGCCCTCAACTCCCGCTGAC  
AACGGTGCCACAGTACGCCCTCGACTCCCGCTGACAGCAGTGCCACAGTACGCCCTCAACTCCC  
GCTGACAGCAGTGTAAGTACGCCCTCAACTCCCTCTGATTTCTTTTTCCACAGTATGTCTTCTTTCC  
CGTAAACAACAGTGCACAGTACGCCCTCAACACCCGCTGACACGAGTGTCTATGGTACGGTTTTG  
ATTTGACAGTGGCGCTGCATTTTCGCCCTTTTCGGGCGGAGGGCTTCTTTTGTGTGCCGGTCTTT  
GCTGCTGCAGTGTTTCGTTATGGCAGTTTTCTGATGTAGTGAGAGAGTCTCCTGACAAATGTAGATAA  
ATTCATAATTGTGCTGTGAACCGTTTGGGTAAATGTGTGTGTGCGCTCTCATAAGGAAATGATTTCCA  
GTAATGTTTTTTTTTTGTTCTCGAACTTTTTGAACAAATCTGCGGACAGACGGTGATGAGTAATTTGAAT  
TTGTTTTTACGGTGTTTTTGTCACTGACCCTTTGTTAAGTGGAGACCGCGTTGGAATGCCGTGAGG  
GCATTGCTGTGTTTTGTTTTCCCTTTTTTTTTTTCCCTTTGTGTTTCTTCAATTTGACGGTTTGCAGC  
CTGACGGTGACCGTTTTTCCCTTTGTGACATAAGGGCCAACCTGCTAGACAGTGGCAGGAGGGCCTGC  
TATCACGACGAGGCATTACGCGACAGGGTCCGACGTGACTACTTTGTGTGGCGCACCTCGAGAGTA  
CTTCTAGAGCGGCCGCGGGCCATCGATTTTCCACCCGGGTGGGGTACCAGGTAAGTGTACCCAATT  
CGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTAACCGCTCACCG

**CLONE 48 (204 pbs)**

GGCAGGAGGTAGTATATTGTCTTATCTGGGGGATATCTTCTCGGGTGCCACACACTATCGGGAGGAG  
GCAAAAAGGGTGACCGGACTTTTGGGGCGGGGGGTCTGCAGGATATCGTACAGACGACTCGTGGGG  
GCCTTGACGGGGAAAAGGCGGGAACGCTGTTGAGAGGACGGAGGGTGGGGGGGAACGAGAATGGG  
GGGTT

**CLONE 51 (234 pbs)**

GGCAGGAGGAAATGTTCAATTAAGGGGCAGGGGTGAATGGGTTT CAGAAGGCGAAGCTCCCGCGGGG  
TTCTTTGGTTCGGGGGGGATGACAGGACAAGGGGCGGTAAAAAAATTTGCCTAAGGAGCGCCATGTT  
GGACGTGAAAGTGTGGGTACGATTTAAAGCGCGATTTGTTGGGGCGATTGAGAGAGAGGGTGGCAC  
GAGCGAGCGTTTTTTTCGGAGCGCTGGTTTTGTGTA

**CLONE 52 (234 pbs)**

GTTTGGGAGGAAATATATCTCCCTTTTTTGTGGGACCTGGGGAGTTTTCCAGCCCTGCGCAGGCATCA  
TTGGGATACTGGGCGCGAAGAAGCCTTTTCAAAGCATCTCCCTTTGGGCACGACCCGTCATTCTTAG  
CTCCCCGACGAACGGCTGGATCAAGTTCGCCTTTT CAGAGGTCCCATTCGTCCAGCAGTGTGATC  
ACGGGAGAAATGGGCGACGCGGTGGGTTGATG

**CLONE 53 (612 pbs)**

CGTCGCCGCCAGCACTCTGCTGTACGCCACTGTGGAAGCGCAGCCATTGAAAAAGGAAGGACCGAA  
GGAAGAGAAGAACTGTA CTGCTCGTACGAGGTTGCTGCAGGGGGAGATAAAATACAACATTACTTTTG  
TGGATCTGACGGAGAAGCTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAAGATGCGT  
ACATTGCGAGGGAATACGGCTGCAGGAATGAATGGGAGAAATAATTGGTACAGTGCATGTGGTGAAGC  
CCTCAATAAGGACTGGTTGGATTCTTATCCAACACGTCAACTGACAGCACGTGGGCAGACGAGTAC  
CTCTGCGTGAATGCCACGGTGAACAAAGGGAAGCCAGCGGCGGATGGTGGATTGACTTTCAAGGG



TCCGGAGCAGGGGCGGAGTGGCCAGTTGGCAAAATGGGGCAGAATGTGCCGTACCACTTTGCGAAC  
GACAAGTTCACCTCTTGTGGCGACAGTGTCCATTCACAAGGAGCCGAAGGGAAGCAGCAGCTCTATCC  
CTTTGATGGGTGTGAGGATGAAACGATGCACAAGGCACCCTGCTCTTTGGTCTTTTCGTACACCCACGA  
AAAGAAGTGGGA

**CLONE 54 (633 pbs)**

GGCAGGAGGAATTCAGCAAAATATGCCACCCATGCTCGCCGCCGCCAAGTCCCTGACTCTCTACAA  
GGACTTCAACAAGGACGTGAAGGACATGCTCACGAAGAGCTACAGCGATGCTCATAAATGGAAAGCTG  
GAGAGTAAATTCAAGGGCCCAGAGGACAAGCTCTTTGTGAACCCCATGGCAACGTCCGATGGCAAGT  
TCAGCGTGGATGTGGAGTACGCTCCAAGGTGCGGCCCGCACTGAAGGCGACGCTTGAGCCCAGCA  
ATTGCAATGCCAACTTGACGGCGTCGTACCTCTGCCAGGGCCACAAGGTGGAGGCTGTGGGAAAGA  
AGAATGGCGAGTATGAGCTCTCCCATGAGTTCGTGATGCCCTCTCGCATGTCGTCGCACGCGAAGTG  
GTGAACAAAACGTGTGGAGGTGGGCGTCGCGACGGCCGTAGCGCCCCACTGCCAAGTGGGATGCGG  
TGCGCTTTACACCCTGGACGGAAGAAGGACTACGACCTGACGCTCGGCTGGCGCTATGCCCATGCT  
GGCTACGCACTGGGGGTCCGCACGAACAAGCTGCGCTCTTACACGACCAGCTTCGTGACGCCGATA  
CCGAAGTGCCCCATCACGTGCTGGTTGGCCCCCA

**CLONE 56 (501 pbs)**

GGTTTACTGGTCAAGCGCCATGGGGAAATGGTGGATGGAGGAATACGACACCCTTTCACGCGTGTGG  
GGCAACTCGCTGAATCGTACAGGGCACGGCGTGCAGGGTGGCTTCGTCAGCGCGATGATCGATGGG  
ACAGAAATACATTCCTCGTCAGTCGGCCGGTATATGCTGAGAAGAACGGTAAAGAAACGGGCCGACA  
TCCCTTGTGGCCGACGGACATGCAACGAATCTATGATGTTGGGCCGATATCCGCTGAGAATGAGGAC  
GTCGCCGCCAGCACTCTGCTGTACGCCACGGTCGAAGCGCAGTCATTGAAAAAGGAAGGACCGAAG  
GAAGAGAAGAACTGTA CTGCTCGTACGAGGTTGCTGCAGAGGGAGATAACTACCACATTACTTTTGT  
GGACCTGACGGAGAAGCTGGAGGAGATGAAGAAGGTGGTGGCTGCATGGAAGGAGAAGGACGCGT  
ACATTGCGAGGGAACACGGCTGCGGGAATGAATGG

## OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)  
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO